



Analyse de l'homéostasie des lipides membranaires d'*Arabidopsis thaliana* par une stratégie de génétique chimique exploitant une nouvelle classe d'analogues du diacylglycérol

Laurence Boudière

► To cite this version:

Laurence Boudière. Analyse de l'homéostasie des lipides membranaires d'*Arabidopsis thaliana* par une stratégie de génétique chimique exploitant une nouvelle classe d'analogues du diacylglycérol. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GREN069 . tel-01062179

HAL Id: tel-01062179

<https://theses.hal.science/tel-01062179>

Submitted on 9 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Végétale**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Laurence Boudière

Thèse dirigée par **Eric Maréchal**

préparée au sein du **Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, CEA-Grenoble**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Analyse de l'homéostasie des lipides membranaires d'*Arabidopsis thaliana*, par une stratégie de génétique chimique exploitant une nouvelle classe d'analogues du diacylglycérol

Thèse soutenue publiquement le **20 Décembre 2013**,
devant le jury composé de :

Hubert Schaller

Directeur de recherche, IBMP Strasbourg, Rapporteur

Sébastien Mongrand

Directeur de Recherche, LBM Bordeaux, Rapporteur

Christelle Breton

Professeur, CERMAV Grenoble, Membre

Thierry Desnos

Chercheur, LBDP CEA Cadarache, Membre

Eric Maréchal

Directeur de Recherche, LPCV CEA Grenoble, Directeur de thèse



A ma famille et à mes amis

Remerciements

Je remercie Monsieur Norbert de m'avoir accueillie dans son laboratoire de Physiologie cellulaire et végétale.

Je remercie vivement Christelle Breton, Hubert Schaller, Sébastien Mongrand et Thierry Desnos pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger cette thèse.

Je voudrais remercier chaleureusement Eric Maréchal qui m'a donné l'opportunité de faire ma thèse dans l'équipe et qui m'a encadrée. Merci de m'avoir donné cette chance que je n'ai jamais oubliée tout au long de ma thèse et pour tous tes conseils, nos conversations qui m'ont enrichie tant scientifiquement que personnellement.

Un grand merci à Maryse Block qui m'a beaucoup aidée dans mes différents projets et consacrée du temps lorsque j'en avais besoin.

Merci à Juliette Jouhet qui m'a énormément appris. Merci pour ta grande disponibilité et toute l'aide que tu m'as apportée dans mes différents projets.

Je remercie chaleureusement Céline et Morgane d'avoir été de bonnes coéquipières de semis et qui m'ont rendu le travail moins long et fastidieux. Merci pour toute cette bonne humeur.

Un grand merci à mon équipe, membres passés et présents sans qui cette thèse n'aurait pas pu se faire et qui m'ont apporté un réel soutien tout au long de ma thèse.

Je remercie Delfinou, Dianou, Floflo, Marina, Melissa, Camille, Sophie, Néma, Poussinou, Perrine, Caro, Lucie, Martino, Serena et Valeria pour ces moments riches en bonne humeur et toutes les soirées.

Merci à Thomthom, mon super coloc, qui a égayé ma fin de thèse et avec qui la vie est une fête.

Merci à Steph, pour tous ces moments géniaux et pour m'avoir supportée même au summum de mon stress.

Merci à Radoux, ami de la science, qui m'a permis de décompresser avec de magnifiques sorties de ski de rando. Merci pour ta légèreté, ton humour et ton soutien.

Un merci tout particulier à Flo, ma coéquipière. Merci de m'avoir accompagnée et tant soutenue pendant ma thèse. Grâce à toi j'ai pu maintenir mon cap sans me décourager et j'ai pu réaliser de nombreux rêves dont un voyage inoubliable. Merci pour toutes ces soirées, ces sorties ski et ces apéros qui m'ont allégé la thèse.

Un énorme merci à mes parents et à Edwige, Ingrid et Pierre, mes frangins, qui m'ont toujours encouragée dans mes choix et n'ont jamais cessé de me soutenir. Merci d'avoir compris le manque de temps que je pouvais passer avec vous à cause du travail. Enfin, merci infiniment pour cette soirée de thèse magnifiquement organisée qui me laisse un beau souvenir.

Sommaire

Introduction	11
Partie bibliographique	21
<hr/>	
I. Préambule: <i>Arabidopsis</i>, une angiosperme de "type C16:3"	21
II. Vue d'ensemble de la synthèse des glycérolipides dans les cellules chlorophylliennes d'<i>Arabidopsis</i>	22
1. Synthèse des acides gras dans le stroma	24
2. Synthèse d'acide phosphatidique, de diacylglycérol et de l'ensemble des glycérolipides qui en dérivent dans le système endomembranaire, suivant la voie eucaryote	26
3. Synthèse d'acide phosphatidique et de diacylglycérol de type procaryote dans les membranes plastidiales	27
4. Origine de l'acide phosphatidique et du diacylglycérol de type eucaryote dans les membranes plastidiales	28
5. Synthèse de glycérolipides dans l'enveloppe plastidiale	28
6. Molécules dérivées des galactolipides	33
III. Etude de l'homéostasie glycérolipidique en combinant l'analyse de réponses à de stress environnementaux, avec des analyses transcriptomiques et génétiques	34
1. Grands principes définissant l'homéostasie glycérolipidique membranaire dans la cellule végétale	34
2. Perturbation du système glycérolipidique par la carence de phosphate	39
3. Couplage métabolique des phospholipides et des galactolipides grâce à l'activation de MGD1 par l'acide phosphatidique	41
IV. Etude de l'homéostasie lipidique en utilisant une nouvelle molécule chimique, la galvestine-1	41
1. La découverte de la galvestine-1 et de son mode d'action	41

2. Effets de la galvestine-1 chez <i>Arabidopsis</i>	45
3. Comparaison des mutants des MGDG synthases et des plantes traitées en présence de galvestine-1	48
4. Gènes candidats identifiés à partir de données transcriptomiques dans différentes conditions altérant l'homéostasie lipidique	50
V. ALA10, une flippase putative identifiée par des analyses transcriptomique après une carence en phosphate et traitement à la galvestine-1	51
1. Les ATPases de type P4	52
2. Les sous-unités des ATPases de type P4	55
3. La famille multigénique des ALA	58
4. Quelques caractéristiques d'ALA10	59
VI. Objectifs de la thèse	61
 Matériel et méthodes	 65
<hr/>	
I. Matériel végétal et méthodes de cultures	65
1. Culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	65
2. Plantes transformées génétiquement	67
3. Plantes porteuses de mutations induites par un traitement chimique en présence de méthanesulfonate d'éthyle (EMS)	68
4. Croisements entre lignées d' <i>Arabidopsis</i>	69
II. Crible pour la sélection de mutants d'<i>Arabidopsis thaliana</i> résistants à la galvestine-1	70
III. Visualisation par Microscopie	71
IV. Techniques d'étude des acides nucléiques	72
1. ADN	72
2. ARN	84
V. Techniques d'étude des protéines	87
1. Analyse des protéines par électrophorèse	87
2. Electrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	88

3. Immunomarquage	89
VI. Analyse de glycérolipides membranaires	89
1. Extraction de glycérolipides selon Folch	89
2. Séparation et dosage des lipides totaux	90

Chapitre 1 : Criblage d'une collection de mutants *d'Arabidopsis*, générés par traitement en présence de méthanesulfonate d'éthyle, pour l'identification de lignées résistantes à la galvestine-1

I. Introduction	95
II. Optimisation du protocole de criblage de mutants EMS résistants à la galvestine-1	97
1. Choix du solvant optimal pour le crible	98
2. Test de différentes conditions pour simplifier la sélection des plantes sensibles et résistantes	99
3. Génération d'une collection de mutants d' <i>Arabidopsis</i> par traitement en présence de méthanesulfonate d'éthyle (EMS)	101
4. Protocole du criblage	102
III. Sélection de lignées mutantes résistantes à la galvestine-1	103
1. Criblage primaire	103
2. Confirmation de la résistance à la galvestine-1	104
IV. Identification du type de mutation des différentes lignées sélectionnées	106
1. Purification des lignées gali par croisements	106
2. Identification du type de mutation	107
V. Caractérisation de la lignée gali1	108
1. Information sur le type de mutation de gali1	108
2. Phénotype de la lignée gali1	109
3. Caractérisation du profil lipidique de la lignée gali1	111
4. Séquençage des gènes de MGDG synthases	116

5. Localisation de la mutation dans le génome de gali1	116
VI. Caractérisation de la lignée gali34	122
1. Information sur le type de mutation de gali34	122
2. Séquençage des gènes des MGDG synthases dans la lignée gali34	124
3. Séquençage des gènes candidats identifiés dans le génome de gali1	124
4. Localisation de la mutation dans le génome de gali34	125
VII. Caractérisation de la lignée gali2	128
1. Phénocopie du mutant <i>superman</i>	128
2. Informations sur le type de mutation de gali2	131
3. Développement de la lignée gali2	132
4. Caractérisation du profil lipidique de la lignée gali2	133
5. Séquençage des gènes des MGDG synthases dans gali2	139
6. Séquençage des gènes candidats identifiés dans le génome de gali1	139
VIII. Caractérisation de la lignée gali7	139
1. Information sur le type de mutation de gali7	139
2. Développement de la lignée gali7	140
3. Séquençage des gènes des MGDG synthases dans gali7	142
4. Séquençage des gènes candidats identifiés dans le génome de gali1	142
IX. Discussion	143

Chapitre 2 : Analyse préliminaire du rôle d'*ALA10* dans la réponse au traitement par la galvestine-1

I. Introduction	151
1. Fouille des variations du transcriptome d' <i>Arabidopsis thaliana</i> induites par une exposition à la galvestine-1	151
2. <i>ALA10</i> , gène codant pour une flippase putative, induit par la galvestine-1 et par la carence de phosphate.	154
II. Caractérisation génomique des lignées mutantes et des constructions utilisés pour l'étude de la flippase putative <i>ALA10</i> (AT3G25610)	155

1. Génotypage et analyse de l'expression d'ALA10 dans la lignée <i>ala10</i> (SALK_024877C)	156
2. Obtention des lignées ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2 et analyse de leur niveau d'expression d'ALA10	160
3. Analyse du niveau d'expression de ALA10 dans des feuilles de plantules cultivées en présence de Galvestine-1	161
III. Relation entre l'expression d'ALA10 et la synthèse des galactolipides	161
1. Effet de la galvestine-1 sur l'expression de gènes liés à la synthèse des galactolipides dans le WT	161
2. Impact possible du niveau d'expression d'ALA10 sur des gènes liés à la synthèse des galactolipides	163
IV. Effet du traitement par la galvestine-1 sur la croissance des lignées <i>ala10</i> et ALA10-GFP	164
1. Croissance et aspect de la rosette des plantules des lignées <i>ala10</i> et ALA10-GFP en présence de galvestine-1	164
2. Développement racinaire de la lignée <i>ala10</i> et des lignées ALA10-GFP en présence de galvestine-1	165
V. Influence de l'expression d'ALA10 sur le profil glycérolipidique chez <i>Arabidopsis</i>	167
VI. Discussion	169
Conclusion	175
Annexes	179
Liste des publications	181
Références	219

Abréviations

ACCase : Complexe Acétyl-CoA carboxylase
ACP : Acyl carrier protein
ACT : Acyl Transférase
ADS1 : Delta-9 acyl-lipid/CoA desaturase
AG : Acides gras
ALA : Aminophospholipid ATPase
ALIS : ALA Interacting Subunit
AOC : Allene oxyde cyclase
AOS : allene oxide synthase
AP : Acide Phosphatidique
ATP : Adénosine triphosphate
ATS : Acyltransferase
Cdc50 : Cell Division Cycle 50
CoA : Coenzyme A
DAG : Diacylglycérol
DGAT : Diacylglycérol acyl-transférase
DGD : DGDG synthase
DGDG : Digalactosyldiacylglycérol
DMSO : Diméthylsulfoxyde
Dnf : Drs2 et Neomycine Family
DPG : Diphosphatidylglycérol
Drs : Defective in Ribosome Synthesis
EMS : méthanesulfonate d'éthyle
FAB : Delta-9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase
FAD : Désaturase d'acides gras
FAE : Acide gras élongase
FAS : Acide gras synthase
gali : Galvestine-1 insensitive
GGGT : Galactolipide:galactolipide galactosyltransferase
GLA : Galactolipase A
Glc : Glucose
GlcADG : Glucuronosyldiacylglycérol
G3P : Glycerol-3-Phosphate
Glyco-SL : Glycosphingolipide
GFP : Green fluorescent protein
IEM : Membrane interne de l'enveloppe
LIP : Homologue de la lipin phosphatidate phosphatase
LOX : Lipoxigenase
Lyso-AP : Acide lyso-phosphatidique
MGD : MGDG synthase
MGDG : Monogalactosyldiacylglycérol
Neo1 : Neomycine resistance 1
NPC : Non-specific phospholipase C
OEM : Membrane externe de l'enveloppe
OPDA : Acide oxo-phytodienoïque
PAP : Phosphatidate phosphatase

Pi : Phosphate
PC : Phosphatidylcholine
PE : Phosphatidyléthanolamine
PG : Phosphatidylglycérol
PI : Phosphatidylinositol
PLA : Phospholipase A
PLC : Phospholipase C
PLD : Phospholipase D
PS : Phosphatidylsérine
PSII : Photosystème II
RE : Réticulum endoplasmique
SAB : Sérum Albumine Bovine
SFR2 : Sensitive to freezing 2
SQDG : Sulfoquinovosyldiacylglycérol
sn : « stereospecific number »
TAG : Triacylglycérol
TGD : Complexe trigalactosyldiacylglycérol
UDP : Uridine diphosphate
VIPP1 : Vesicle-including protein in plastids

Introduction

Introduction

Comme toutes les cellules eucaryotes, les cellules végétales sont constituées de compartiments membranaires, avec d'une part le *système endomembranaire* (réticulum endoplasmique, enveloppe nucléaire, appareil de Golgi, réseau trans-Golgi, vacuole et membrane plasmique) relié dynamiquement par un intense réseau de tubules membranaires et de trafic vésiculaire, et d'autre part des *organites semi-autonomes*, la mitochondrie, commune à l'ensemble des eucaryotes, et le plaste, spécifique des végétaux. Le chloroplaste est le type de plaste le plus courant, siège de la photosynthèse (Figure I 1, A). Il est délimité par une enveloppe, composée d'une membrane externe (OEM, Outer Envelope Membrane) et d'une membrane interne (IEM, Inner Envelope Membrane, Figure I 1, B). Les membranes photosynthétiques (thylacoïdes) dans lesquelles les complexes multi-protéiques responsables de la photosynthèse sont insérés, sont localisées dans le stroma.

Chacune des membranes limitant les compartiments de la cellule végétale possède une composition en lipides polaires qui lui est spécifique. Ainsi les membranes du système endomembranaire sont riches en phospholipides (Joyard et al., 1998). Les membranes du chloroplaste, quant à elles, sont riches en glycolipides non phosphatés, principalement des galactolipides (voir Tableau I 1).

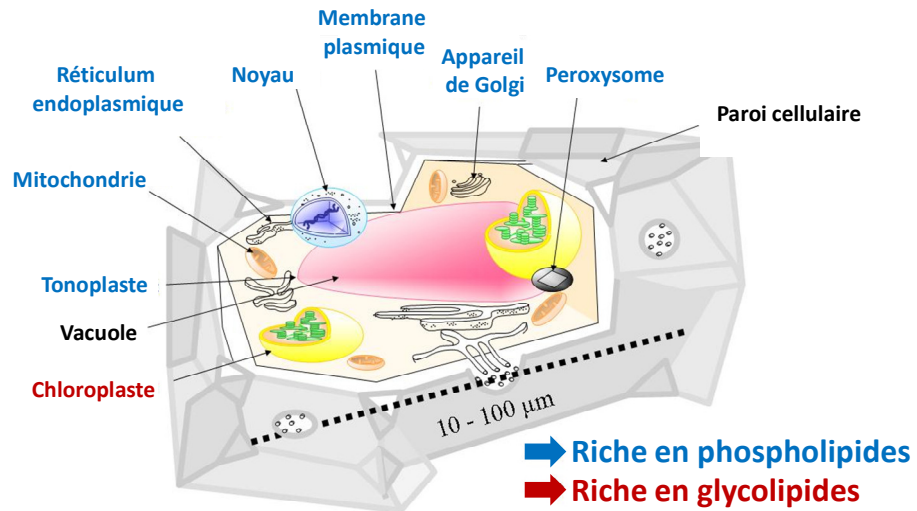
Les glycérolipides sont des lipides polaires dont la structure de base est un diacylglycérol (DAG), lui-même constitué d'un squelette glycérol sur lequel sont liés deux acides gras par estérification. La position des acyls estérifiés sur le glycérol est appelée « stereospecific number » (*sn*), les acyls étant liés au niveau des positions *sn*-1 et/ou *sn*-2 (Figure I 2, A). Une tête polaire est liée en position *sn*-3.

Il est possible de distinguer deux grandes catégories de glycérolipides membranaires chez les plantes, en fonction de la nature de la tête polaire:

- d'une part les *phosphoglycérolipides*, possédant une tête polaire phosphorylée, le plus abondant étant la phosphatidylcholine (PC);
- d'autre part les *glycoglycérolipides non-phosphatés*, synthétisés exclusivement dans l'enveloppe qui limite les plastides, et qui sont au cœur de ce sujet de thèse (Figure I 2, B).

Introduction

A



B

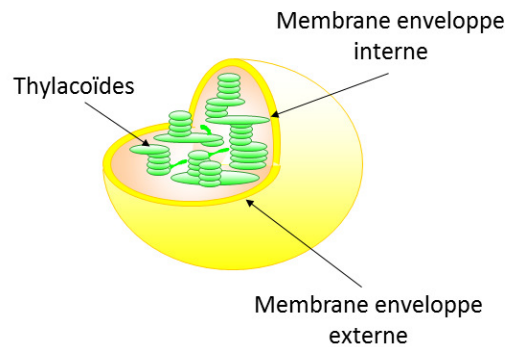


Figure I 1 : Les compartiments de la cellule végétale. A) Schéma d'une cellule végétale photosynthétique. Les cellules végétales contiennent plusieurs organites délimités par des membranes qui peuvent avoir des compositions en glycérolipides différentes. Le système endomembranaire (réticulum endoplasmique, enveloppe nucléaire, appareil de Golgi, réseau trans-Golgi, vacuole, réseau de tubules et de vésicules membranaires, membrane plasmique) et la mitochondrie ont des membranes riches en phospholipides (indiqués en bleu). Les membranes du chloroplaste sont riches en galactolipides (indiqués en rouge). **B) Schéma de la compartimentalisation membranaire du chloroplaste.**

Les glycoglycérolipides portent une tête polaire qui contient un ou plusieurs hexoses. Parmi ceux-ci, les galactoglycérolipides, contiennent une tête polaire composée d'un ou plusieurs galactoses. Ils comprennent le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG). Le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG), aussi appelé le sulfolipide, possède une tête polaire dérivée d'un hexose sulfaté. Le SQDG est en proportion plus faible par rapport aux MGDG et DGDG (voir Tableau I 1) (Block et al., 1983). Enfin, un autre glycoglycérolipide non-phosphaté, le glucuronosyldiacylglycérol (GlcADG), produit dans le plaste par les enzymes synthétisant habituellement le sulfolipide, a

Introduction

été très récemment identifié (Okazaki et al., 2013). Ce lipide est en proportion mineure et ne sera pas détaillé dans ce manuscrit.

Les galactoglycérolipides représentent jusqu'à 80% des lipides des membranes photosynthétiques (Hartmann and Benveniste, 1987) et constituent environ 50 % des lipides totaux de la plante (Jouhet et al., 2007). De par l'importance des organismes photosynthétiques, les galactoglycérolipides constituent la classe lipidique la plus abondante de la biosphère (Gounaris and Barber, 1983). Ces lipides sont synthétisés exclusivement dans les membranes limitant les plastides et ont de multiples fonctions. Outre leurs rôles de composants des membranes du chloroplaste, les rendant essentiels pour la biogenèse des thylacoïdes, ils interagissent spécifiquement avec des sous-unités protéiques de complexes tels que la machinerie d'import de protéines du chloroplaste (van 't Hof et al., 1991) ou les photosystèmes (Härtel et al., 1997; Härtel et al., 1998).

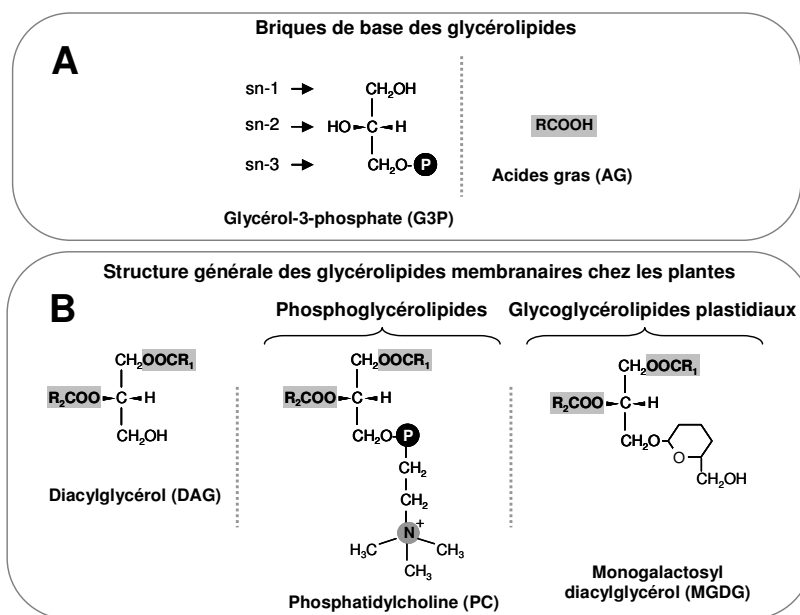


Figure I 2 : Structure des glycérolipides membranaires dans les cellules végétales. A) Précurseurs communs à l'ensemble des glycérolipides. Le glycérol-3-P (G3P) est à la base du squelette commun à l'ensemble des glycérolipides, sur lequel sont liés par estérification deux acides gras en position *sn*-1 et/ou *sn*-2 (RCOOH) et un groupe phosphaté en position *sn*-3. **B) Représentation de la structure générale des glycérolipides membranaires dans les cellules végétales.** Le diacylglycérol (DAG) est la structure la plus simple. Les phospholipides possèdent une tête polaire phosphatée en position *sn*-3, par exemple la phosphocholine pour la phosphatidylcholine (PC). Les glycolipides plastidiaux ont une tête polaire non phosphatée, par exemple un galactose, pour le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG).

Introduction

Membranes	Phospholipides						Galactolipides			Stérols	Glyco-SL
	PC	PE	PG	PI	PS	DPG	MGDG	DGDG	SQDG		
Système endomembranaire ^A											
Réticulum + Golgi	43-48	23-26	6	6	3					4-15	
Tonoplaste	15-28	15-28	2	5-9	2					14-43	12-17
Membrane plasmique	8-36	9-32	1-5	1-6	1-10					5-60	6-30
Chloroplastes ^B											
Membrane externe	32		10	5			17	30	6		
Membrane interne			9	1			55	30	5		
Thylacoïdes			7	1			58	27	7		
Mitochondries ^C											
Membrane externe	52	22	3	10						13	
Membrane interne	37	33	2	4		11				13	

Tableau I 1 : Composition lipidique des membranes des cellules végétales. La distribution des lipides est donnée en pourcentage des lipides totaux. **A) Analyse de compartiments représentatifs du système endomembranaire** (Hartmann and Benveniste, 1987; Bertho et al., 1991; Tavernier et al., 1993; Moreau et al., 1998). **B) Analyse des membranes plastidiales** (Block et al., 1983; Joyard et al., 1998). **C) Analyse des membranes mitochondriales** (Douce, 1985). PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidyléthanolamine ; PG, phosphatidylglycérol ; PI, phosphatidylinositol ; PS, phosphatidylsérine ; DPG, diphosphatidylglycérol ; MGDG, monogalactosyldiacylglycérol ; DGDG, digalactosyldiacylglycérol ; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycérol ; Glyco-SL, Glycosphingolipides.

Le *profil glycérolipidique* d'une membrane peut être représenté sous forme d'un histogramme donnant les pourcentages molaires de chaque classe lipidique en présence. Un aspect remarquable de la biologie des eucaryotes réside dans le fait que les profils glycérolipidiques de chaque compartiment membranaire sont maintenus à des états stationnaires. Il existe donc un processus *homéostatique* qui régule ce système dans son ensemble, probablement au niveau de points de contrôles permettant de coupler plusieurs voies métaboliques distantes dans la cellule. La composition en lipides polaires de chaque compartiment membranaire peut aussi varier en fonction du contexte développemental et physiologique ou encore en réponse aux variations environnementales. Un nouvel équilibre peut s'établir, suivant un processus appelé "remodelage lipidique". A l'échelle cellulaire, l'homéostasie lipidique membranaire résulte de la combinaison de la néosynthèse de

Introduction

glycérolipides, de leur inter-conversion, avec des modifications possibles des têtes polaires ou des acides gras, et enfin du trafic de ces lipides au sein des membranes et d'un compartiment à un autre. Au cours d'un remodelage lipidique, plusieurs mécanismes peuvent être mobilisés, parmi lesquels 1) la régulation du niveau d'expression de gènes codant pour des enzymes de néosynthèse, de maturation ou de conversion lipidique, ou encore des protéines impliquées dans le trafic lipidique, 2) la régulation de la stabilité de ces protéines, de leur renouvellement et de leurs modifications post-traductionnelles, 3) la régulation de la localisation de ces protéines et enfin 4) la régulation des activités enzymatiques par des boucles de contrôle et/ou de rétro-contrôle, suivant les schémas de régulations métaboliques classiques.

Ce type de remodelage est particulièrement bien connu lorsque la plante est exposée à une carence en phosphate (Pi) (Härtel et al., 2000; Benning et al., 2006). Une réorganisation des lipides membranaires se produit dans tout l'ensemble des compartiments subcellulaires, avec en particulier une hydrolyse des phosphoglycérolipides et une augmentation de la teneur globale en galactoglycérolipides (Benning et al., 2006). Des études, menées entre autre au laboratoire, ont permis de mettre en évidence d'une part que l'augmentation de la production de galactoglycérolipides se produisait en utilisant des précurseurs dérivés de l'hydrolyse des phospholipides, et d'autre part qu'un export de DGDG s'opérait du chloroplaste vers des membranes non-plastidiales, plus particulièrement au niveau de la membrane plasmique, du tonoplaste et de l'enveloppe mitochondriale (Andersson et al., 2003; Jouhet et al., 2004; Jouhet et al., 2007). Suite à une carence de Pi, il a ainsi été possible de montrer que les phosphoglycérolipides étaient hydrolysés par un clivage spécifique au niveau de leurs têtes polaires, par l'action de phospholipases C et D (PLC et PLD respectivement). Les processus de transports lipidiques impliqués dans ce remodelage lipidique particulier sont encore mal connus, mais ils requièrent l'existence d'une communication entre les différents organites, vraisemblablement au niveau de zones de contact (Jouhet et al., 2004). Ce trafic lipidique est un système complexe et dynamique, non élucidés à ce jour, qui répond aux besoins de la plante en adaptant les compositions lipidiques de membranes.

Considérant le métabolisme des glycérolipides comme un *système* (appelé ici système glycérolipidique), une part importante de ses éléments constitutifs, en particulier des enzymes, a été élucidée (voir Partie Bibliographique), mais de nombreux composants sont encore inconnus. Une des méthodes pour étudier un système consiste à le perturber. Ainsi des mécanismes de régulations sont mis en œuvres pour rétablir un état d'équilibre et de nouveaux acteurs ou de nouvelles voies peuvent être mis en évidence. Comme nous l'avons

vu, la perturbation du système glycérolipidique peut être provoquée chez *Arabidopsis*, par une carence en Pi. L'analyse des réponses transcriptomiques et physiologiques ont ainsi permis de pointer des acteurs protéiques, tels que des transporteurs putatifs ou des phospholipases, dont le rôle dans le système glycérolipidique n'avait pas été établi.

L'identification et la caractérisation de nouveaux acteurs impliqués dans l'établissement et le contrôle de l'homéostasie lipidique est une question centrale de ma thèse, et nous nous sommes proposés d'aborder cette question avec une stratégie différente. Une nouvelle petite molécule récemment découverte par l'équipe, issue d'un criblage chimique à haut débit, appelée galvestine-1, est un inhibiteur de la synthèse des galactolipides et nous permet de nous engager dans cette étude (Botte et al., 2011). L'avantage de cette petite molécule est qu'elle cible spécifiquement une famille d'enzymes, les MGDG synthases, qui sont à la charnière entre le métabolisme des phosphoglycérolipides et des glycolipides non-phosphatés. En effet, comme cela sera détaillé dans la Partie Bibliographique, les MGDG synthases peuvent utiliser des substrats néosynthétisés au niveau des plastides ou dérivant de phosphoglycérolipides extra-plastidiaux (Miege et al., 1999). De plus, il a été montré au laboratoire qu'une de ses isoformes, MGD1, était activée par l'acide phosphatidique, ce qui peut permettre de coupler les activités de synthèses plastidiales par un lipide signal produit à l'extérieur du plaste (Dubots et al., 2010; Dubots et al., 2012).

L'objectif de ma thèse a donc visé à identifier et caractériser des gènes impliqués dans l'établissement et le contrôle de l'homéostasie lipidique, basée sur une stratégie de génétique chimique, en utilisant la galvestine-1 et en me concentrant sur le contrôle de la synthèse des galactoglycérolipides.

Une première partie de ma thèse a consisté à réaliser un crible d'une collection de mutants d'*Arabidopsis thaliana*, générée par un traitement au méthanesulfonate d'éthyle (EMS). Ce crible a été conçu de façon à sélectionner les plants résistants à la galvestine-1, pour identifier des gènes dont la mutation pourrait conférer cette résistance. Nous émettons l'hypothèse que certains des gènes ainsi identifiés devraient jouer un rôle dans le système glycérolipidique, au niveau du contrôle de la synthèse des galactoglycérolipides. Cette approche suit donc une stratégie de génétique chimique.

Une autre partie de ma thèse a été une approche de type gène candidat. Avant mon arrivée dans l'équipe, des données transcriptomiques (puce Affymetrix genome array genechip) ont été obtenues à partir de plantules d'*Arabidopsis thaliana* traitées à différentes

Introduction

doses de galvestine-1. L'analyse des gènes dont l'expression varie a permis de pointer des candidats liés au métabolisme des lipides. Nous nous sommes ainsi intéressés à la protéine ALA10, une flippase putative, dont le gène est sur-exprimé après traitement à la galvestine-1 et ayant aussi un rôle possible lors d'une carence en phosphate. Durant ma thèse j'ai donc analysé la relation entre l'expression du gène codant pour ALA10 et l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie lipidique chez *Arabidopsis thaliana*. J'ai de plus contribué à une étude phénotypique d'un mutant invalidé au niveau du gène *ALA10*, ainsi que des plantes transformées pour exprimer la protéine correspondante.

Partie bibliographique

Partie bibliographique

I. Préambule: *Arabidopsis*, une angiosperme de "type C16:3"

Dans la plupart des systèmes membranaires des cellules animales ou végétales, les lipides polaires majeurs sont les phosphoglycérolipides. Les *membranes des plastes*, en revanche, possèdent une composition tout à fait originale car elles sont constituées essentiellement de glycolipides (galactolipides et sulfolipide) et sont pauvres en phosphoglycérolipides (Joyard et al., 1998).

Le monogalactosyldiacylglycérol ou MGDG et le digalactosyldiacylglycérol ou DGDG sont formés par assemblage de trois types de molécules : du glycérol, des acides gras et du galactose (Figure B 1). Les AG varient par leurs longueurs de chaîne (16 ou 18 atomes de carbone, C16 et C18, respectivement) et leurs niveaux d'insaturation, allant d'espèces totalement saturées à des acyls ayant trois doubles liaisons (du C16:0 au C16:3 et du C18:0 au C18:3). L'analyse des positions *sn*-1 et *sn*-2 a permis de définir deux grands groupes structuraux. Le premier possède en position *sn*-2 des AG en C16 uniquement. Il est dit de structure "procaryote" par analogie avec les glycérolipides de cyanobactéries (Heinz, 1977). Le second groupe possède des AG en C18 en position *sn*-2 et est dit de structure "eucaryote" car il est typique des glycérolipides extraplastidiaux comme la PC (dont l'espèce majoritaire est le C18:2/C18:2). La structure eucaryote est majoritaire chez les plantes dites de "type C18:3" telles que le pois. Les galactolipides d'*Arabidopsis thaliana* et de l'épinard possèdent les deux structures (Allen et al., 1964) et sont par conséquent riches en acides gras C16:3. Pour cette raison, ces plantes sont appelées plantes de type C16:3 (Heinz, 1977).

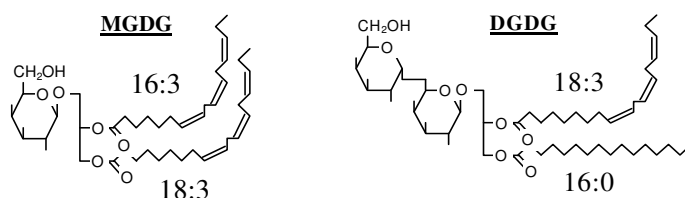


Figure B 1 : Exemple de structures de galactolipides présents chez *Arabidopsis thaliana*, une plante en C16:3. MGDG, monogalactosyldiacylglycérol ; DGDG, digalactosyldiacylglycérol. Sur cet exemple, la position *sn*-1 du MGDG est principalement estérifiée à l'acide linoléique (C18:3). La position *sn*-2 est quant à elle estérifiée à du C16 (structure procaryote).

Les travaux présentés dans ce mémoire ont donc été réalisés dans un modèle de plante choisi initialement pour la disponibilité de données génomiques et la possibilité de réaliser des études génétiques et moléculaires. Le contexte métabolique dont nous devons tenir compte est celui d'une synthèse particulièrement intégrée, avec des précurseurs issus de voies plastidiales (procaryote) et extraplastidiales (eucaryote).

II. Vue d'ensemble de la synthèse des glycérolipides dans les cellules chlorophylliennes d'*Arabidopsis*

A l'échelle cellulaire, le métabolisme lipidique implique donc la collaboration de plusieurs organites. De façon schématique, le stroma des chloroplastes est le site de néosynthèse des acides gras (AG) par l'action de l'acide gras synthase de type II (Fatty acid synthase of type II, FAS II). La biosynthèse des glycérolipides se déroule ensuite au niveau de deux sites majeurs : le système endomembranaire qui produit la plupart des phospholipides et le chloroplaste qui est le siège de la synthèse des glycolipides non-phosphatés (Figure B 1).

Les AG portent une signature définie par leur nombre de carbone et de doubles liaisons, signature qui a joué un rôle essentiel dans les travaux pionniers sur le métabolisme lipidique des plantes, permettant de suivre les voies de synthèse et le trafic des intermédiaires métaboliques. Dans cette présentation, le système schématisé sur la Figure B 2, est décrit à partir de la synthèse des AG, et en suivant précisément ces signatures AG.

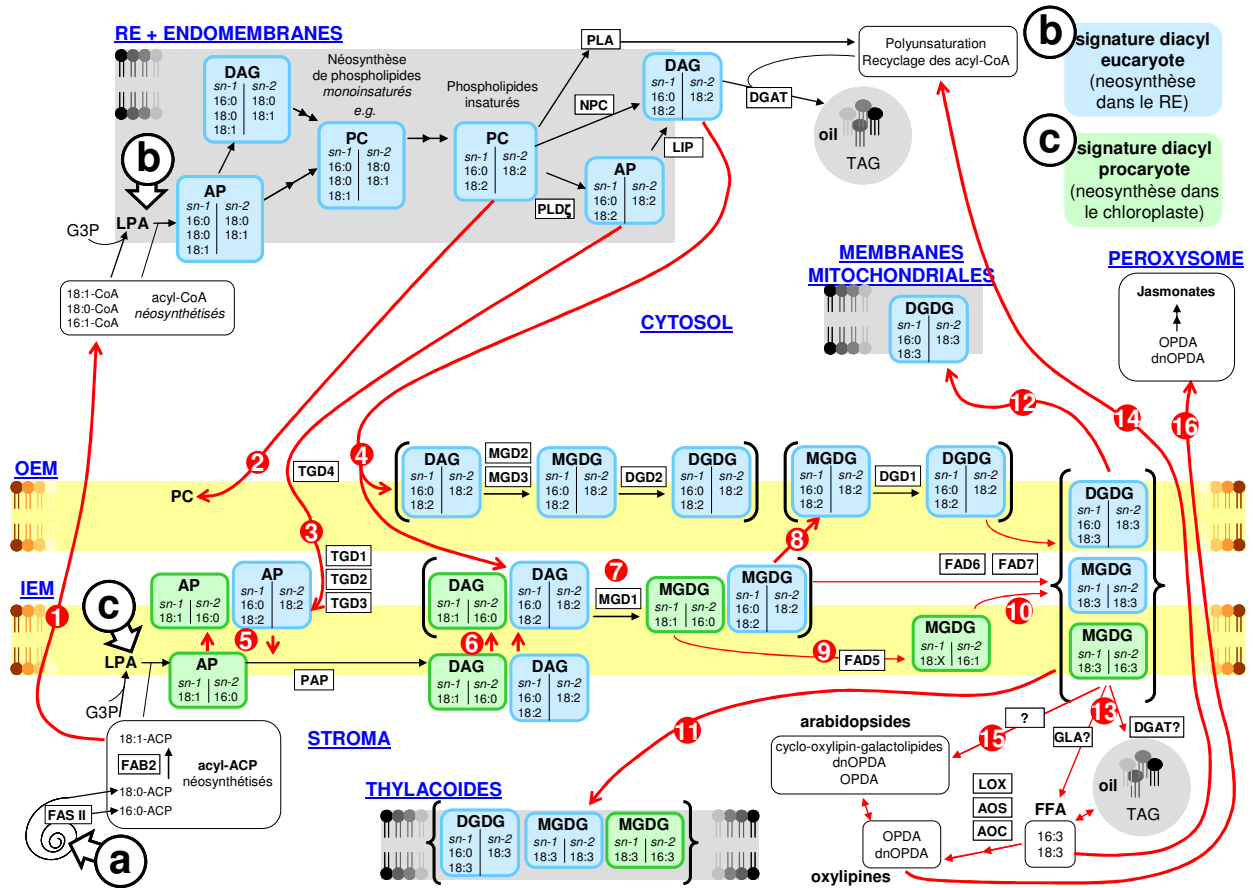


Figure B 2 : Schéma de synthèse des glycérolipides dans la cellule végétale d'*Arabidopsis thaliana*. Biosynthèse des acides gras dans le stroma. Biosynthèse de l'acide phosphatidique et du diacylglycérol de type "eucaryote" dans le réticulum endoplasmique. Biosynthèse de l'acide phosphatidique et du diacylglycérol de type "procaryotes" dans l'enveloppe du chloroplaste. Pour chaque lipide, le profil en acides gras est indiqué, avec le nombre d'atomes de carbone, les principaux niveaux d'insaturation (16:0 à 16:3 et 18:0 à 18:3) et l'estérification aux positions *sn*-1 et *sn*-2 du glycérol. Les lipides de type "eucaryote" sont notés en bleu et les lipides de type "procaryote" pour lesquels le squelette diacylglycérol est d'origine plastidiale sont notés en vert. Abréviations des compartiments cellulaires : RE, réticulum endoplasmique ; IEM, membrane interne de l'enveloppe ; OEM, membrane externe de l'enveloppe. Abréviations des métabolites lipidiques : ACP, acyl carrier protein ; DAG, diacylglycérol ; DGDG, digalactosyldiacylglycérol ; G3P, glycérol-3-phosphate ; Lyso-AP, acide lyso-phosphatidique ; MGDG, monogalactosyldiacylglycérol ; OPDA, acide oxo-phytodienoïque ; AP, acide phosphatidique ; PC, phosphatidylcholine ; PG, phosphatidylglycérol ; TAG, triacylglycérol. Abréviations pour les protéines : ADS1, delta-9 acyl-lipid/CoA desaturase ; AOC, allene oxyde cyclase ; AOS, allene oxyde synthase ; DGAT, diacylglycérol acyl-transférase ; DGD1 et DGD2, DGDG synthases 1 et 2 ; FAB2, delta-9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase ; FAD5, palmitoyl-MGDG Δ^7 -desaturase ; FAD6, ω 6 fatty acid desaturase ; FAD7, ω 3 fatty acid desaturase ; FASII, système multienzymatique de l'acide gras synthase de type II ; GLA, galactolipase A ; LIP, homologue de la lipin phosphatidate phosphatase ; LOX, lipoxygénase ; MGD1, MGD2, MGD3, MGDG synthases 1, 2 et 3 ; NPC, non-specific phospholipase C ; PAP, phosphatidate phosphatase ; PLA, phospholipase A ; PLD ζ , phospholipase D ζ ; TGD1, TGD2 et TGD3, composants du transporteur TGD ; TGD4, protéine associée au transporteur TGD, et liant l'AP. Les flèches rouges numérotées de 1 à 16 indiquent des voies de synthèses, de conversions de lipides ou de trafics intracellulaires, pour lesquels les acteurs protéiques, la localisation fine et les mécanismes moléculaires ne sont pas complètement identifiés.

1. Synthèse des acides gras dans le stroma

Les AG sont des chaînes aliphatiques, ayant des propriétés particulièrement hydrophobes lorsque le nombre de carbones excède 8 à 10. Leur synthèse s'effectue dans le stroma du chloroplaste à partir d'un substrat thio-ester d'origine cytosolique, l'acétyl-CoA. La toute première étape est réalisée par une enzyme dépendante de la biotine, l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase) (Tong, 2013). L'ACCase catalyse d'abord la carboxylation de la biotine à partir d'un substrat carbonate d'hydrogène (HCO_3^-), qui sert ensuite pour la carboxylation de l'acétyl-CoA, permettant la formation de malonyl-CoA. Le groupement malonyl est alors trans-estérifié à l'acyl carrier protein sous l'action d'une malonyl-CoA:ACP malonyltransférase, produisant ainsi du malonyl-ACP (Joyard et al., 2010).

L'élongation des AG se réalise par le transfert de 2 carbones provenant du malonyl-ACP vers l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par le complexe multienzymatique de l'acide gras synthétase de type II (ou Fatty acid synthase of type II, FAS II) (Joyard et al., 2010). Ce système se retrouve chez l'ensemble des bactéries, des cyanobactéries et à l'intérieur des plastides des algues, des plantes et des protistes (Goodman and McFadden, 2007). Dans un premier temps, la céto-acyl-ACP synthase catalyse le transfert d'un carbone provenant du malonyl-ACP sur l'acétyl-ACP formant un groupement β -céto-acyl. Le groupement cétone est réduit en alcool par la β -céto-acyl-ACP réductase NADPH dépendante. L'enoïl-ACP hydratase catalyse ensuite la formation d'un groupement *cis*-2,3-enoïl, qui est réduit par l'enoïl-ACP réductase. Le groupement acyl saturé ainsi formé est transféré sur un ACP libre par l'ACP acyltransférase. Plusieurs isoformes de KAS ont été identifiées et sont spécifiques de la longueur de la chaîne carbonée. Ainsi la KAS III transfère 2 carbones sur l'acétyl-CoA, puis KAS I catalyse les réactions de C4 à C16 et enfin KAS II de C16 à C18 (Joyard et al., 2010).

Sept cycles sont nécessaires pour la synthèse du palmitate (C16:0) et huit pour l'acide stéarique (C18:0). Une stéaroyl-ACP $\Delta 9$ désaturase catalyse la désaturation du C18:0-ACP en C18:1-ACP (voir plus loin). Au terme des réactions de synthèse catalysées par la FASII, du C16:0-ACP, C18:0-ACP et C18:1-ACP sont donc produits dans le stroma des chloroplastes. Les acyl-ACP peuvent ensuite être directement pris en charge par une acyl-ACP thioesterase qui hydrolyse la partie ACP et fournit des acides gras libres au niveau de la membrane interne de l'enveloppe plastidiale (Figure B 3, A et B) (Joyard et al., 2010). Ceux-ci peuvent être ensuite transportés vers la membrane externe de l'enveloppe pour être convertis en acyl-CoA,

vraisemblablement par l'action d'une acyl-coA synthétase (ACS), alimentant ainsi la synthèse des glycérolipides cytosoliques (Koo et al., 2004; Joyard et al., 2010) (Figure B 2, flèche 1). Les acyl-ACP et acyl-coA sont des précurseurs pour la formation des glycérolipides (décrite ici) et des sphingolipides, mais aussi pour la synthèse des cires et cutines (Kunst and Samuels, 2003) ou encore des phyto-oxylinines (Blee, 2002).

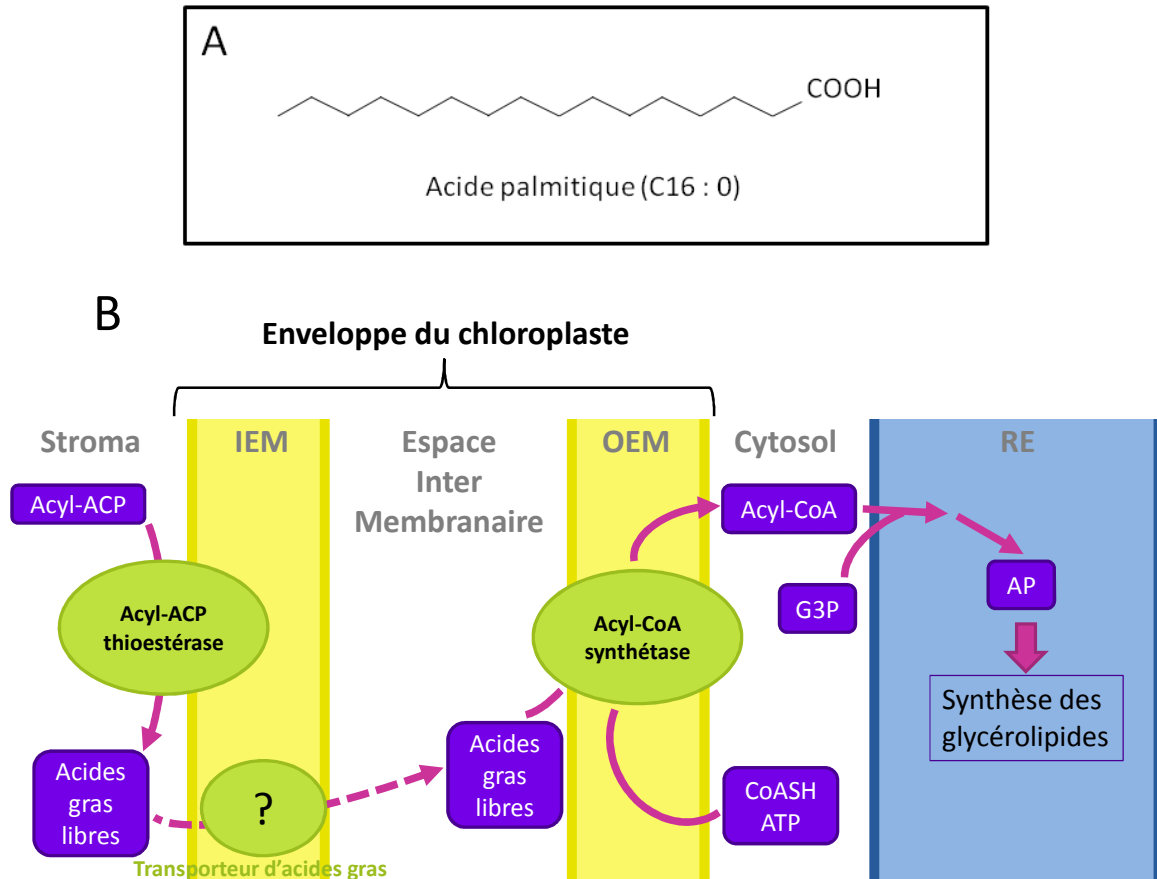


Figure B 3 : Export des acides gras du plaste vers le cytosol et alimentation de la synthèse des glycérolipides eucaryotes. A) Exemple de la formule d'un acide gras, l'acide palmitique C16:0. B) Modèle de l'export des acides gras du plaste vers le cytosol. Les acyl-ACP sont vraisemblablement pris en charge par des acyl-ACP thioestérases pour produire des acides gras libres au niveau de la membrane interne de l'enveloppe (IEM) (Joyard et al., 2010). Les AGL sont ensuite transportés par un mécanisme non élucidé à la membrane externe de l'enveloppe (OEM) où ils seraient pris en charge par une acyl-CoA synthétase pour la production d'acyl-CoA. L'association de glycérol-3-phosphate (G3P) et d'acyl-CoA au niveau du réticulum endoplasmique donne après quelques réactions de l'acide phosphatidique (Dubots et al., 2012), un précurseur de la synthèse des glycérolipides.

Les AG néoformés sont saturés. L'addition de doubles liaisons peut être catalysée par des désaturases et se fait en *cis* à l'exception de la désaturase FAD5 qui catalyse l'addition d'une double liaison de type *trans* sur le 16:0 en position *sn*-1 du phosphatidylglycérol (Ohlrogge and Browse, 1995; Dormann and Benning, 2002). Suivant les désaturases, ces doubles liaisons sont introduites à des positions précises de la chaîne carbonée. Par exemple, nous avons indiqué plus haut que le 18:0-ACP était désaturé dans le stroma en 18:1-ACP par

une Δ^9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase (FAB2). La plupart des glycérolipides sont néosynthétisés à partir des groupes acyls 16:0 (acide palmitique) et 18:1 (acide oléique). Les groupements acyls aux positions *sn*-1 et *sn*-2 peuvent être poly-insaturés par différentes désaturases formant par exemple du 18:2 (acide linoléique) ou encore du 18:3 (acide linoléique). La présence d'insaturations peut modifier d'une part *les propriétés physico-chimiques globales* des glycérolipides au sein des membranes. Des études ont montrés que l'augmentation de la production d'AG insaturés augmentait par exemple la fluidité membranaire, ce qui contribuerait à l'adaptation de la plante à certains stress environnementaux tels que le froid ou la sécheress(Nishida and Murata, 1996; Los et al., 2013). Par ailleurs, le niveau d'insaturation des AG aurait également une influence plus *spécifique, par des interactions lipides-protéines*, sur certains processus physiologiques, tels que la photosynthèse, car les glycérolipides présentant des groupement acyls insaturés stabilisent certaines sous-unité de la machinerie photosynthétique (en particulier au niveau du photosystème II), dans les membranes thylacoïdiennes (Moon et al., 1995).

2. Synthèse d'acide phosphatidique, de diacylglycérol et de l'ensemble des glycérolipides qui en dérivent dans le système endomembranaire, suivant la voie eucaryote

Les acyls-CoA cytosoliques et le glycérol-3-phosphate (G3P) sont des précurseurs de la synthèse de l'acide lyso-phosphatidique (Lyso-AP) et de l'acide phosphatidique (Dubots et al., 2012) dans le réticulum endoplasmique (Figure B 2, flèche 2 et Figure B 3, B). La composition de l'AP en AG dépend de l'affinité des acyl-transférases du RE, ce qui conduit à une biosynthèse d'AP contenant du 16:0, 18:0 ou 18:1 en position *sn*-1 et 18:0 ou 18:1 en position *sn*-2 (Frentzen et al., 1983). L'AP peut être déphosphorylé en DAG par des phosphatidate phosphatases (Figure B 2, voie b). L'AP et le DAG sont à l'origine de tous les phospholipides synthétisés dans le RE. En effet l'AP est le précurseur du PG, du phosphatidylinositol (PI) ou de la phosphatidylsérine (PS) par la voie du CDP-DAG. Le DAG est le précurseur de la phosphatidyléthalamine et de la PC par la voie Kennedy (Dubots et al., 2012). Le DAG peut également être acylé en position *sn*-3, produisant alors des triacylglycérols (TAGs). Les glycérolipides membranaires ainsi générés dans le RE,

comportant en position *sn*-2 des AG à 18 carbones, ont la signature de la voie « eucaryote » (Figure B 2, voie b) (Heinz and Roughan, 1983; Jouhet et al., 2007; Joyard et al., 2010).

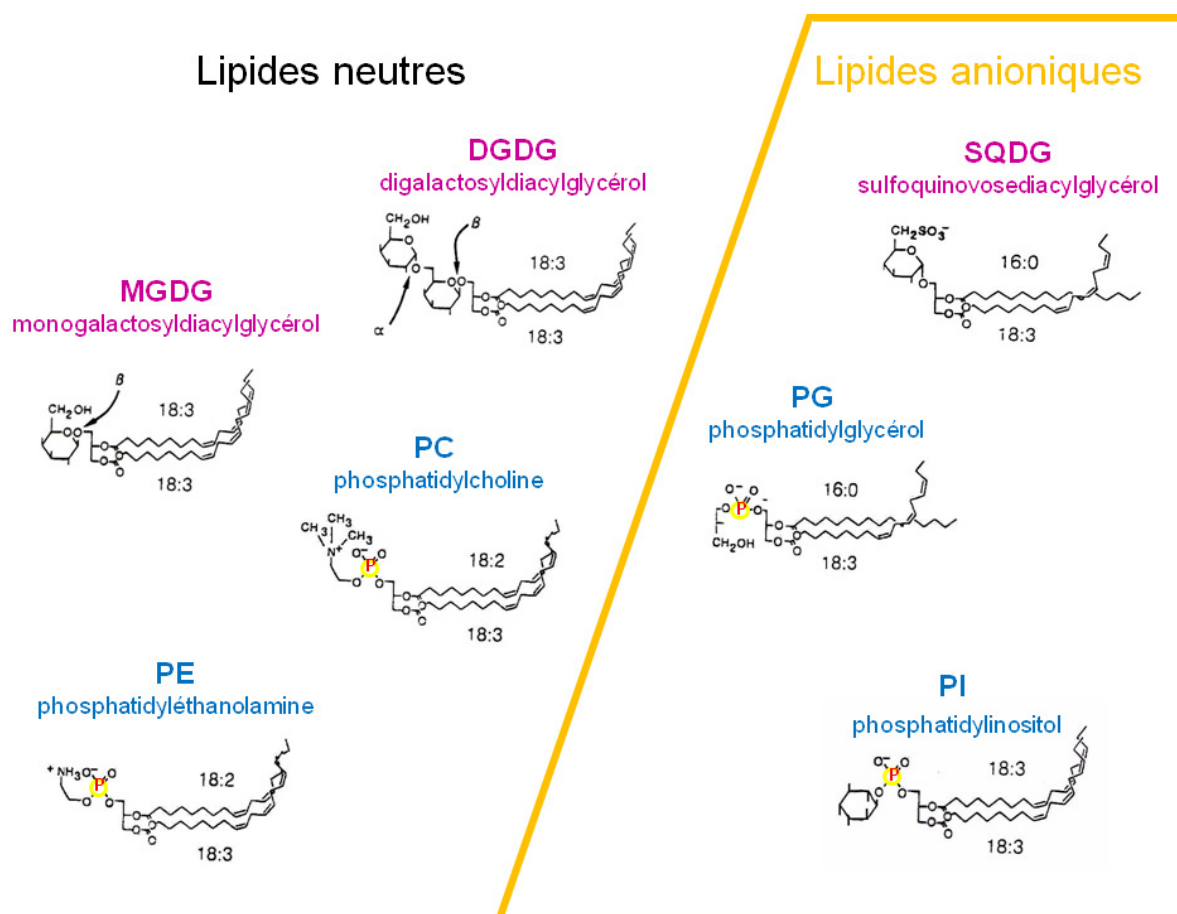


Figure B 4 : Structure des principaux glycérolipides des plantes. Les glycérolipides peuvent être classés en plusieurs catégories suivant leurs caractéristiques. Les glycérolipides MGDG, DGDG et SQDG sont représentés en violet. Les phosphoglycérolipides, i.e. PC, PE, PG et PI sont représentés en bleu. Suivant les caractéristiques des têtes polaires, les glycérolipides peuvent être neutres ou anioniques (encadrés en jaune) au pH physiologique de la plante. Les glycérolipides neutres comprennent le MGDG, le DGDG, la PC ou encore la PE. Les glycérolipides anioniques comprennent le SQDG, le PG et le PI (encadrés en jaune). DGDG, digalactosyldiacylglycérol ; MGDG, monogalactosyldiacylglycérol ; PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidylethanolamine ; PG, phosphatidylglycérol ; PI, phosphatidylinositol ; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycérol.

3. Synthèse d'acide phosphatidique et de diacylglycérol de type procaryote dans les membranes plastidiales

La synthèse de lyso-AP, d'AP et de DAG de structure procaryote se produit au niveau de la membrane interne de l'enveloppe chez *Arabidopsis thaliana* (Jouhet et al., 2007). Un acide gras est estérifié sur la position *sn*-1 du G3P par l'action d'une première acyltransferase, ATS1 qui utilise préférentiellement du 18:1-ACP en tant que substrat, formant du lyso-AP.

Une seconde acyltransferase, ATS2, catalyse ensuite le transfert d'un acyl, préférentiellement du 16:0, à la position *sn*-2 du lyso-AP, générant ainsi un AP de structure procaryote 18:1/16:0 (Heinz and Roughan, 1983; Jouhet et al., 2007; Joyard et al., 2010) (Figure B 2, voie c glycérolipides notés en vert). Les acyltransférases non plastidiales ont une affinité plus importante pour des acyls en C18 (Frentzen et al., 1983). Ainsi, la formation d'AP contenant du C18 en position *sn*-2 représente une des signatures de la voie eucaryote. L'AP est ensuite déphosphorylé en DAG par l'action d'une phosphatidate phosphatase dans la membrane interne de l'enveloppe (Dubots et al., 2012). La PAP plastidiale n'a pas encore été caractérisée moléculairement de façon non-équivoque.

4. Origine de l'acide phosphatidique et du diacylglycérol de type eucaryote dans les membranes plastidiales

La présence de structures de type eucaryote chez les galactoglycérolipides plastidiaux nécessite qu'une source d'AP et / ou de DAG d'origine extraplastidiale soit disponible, en proportion importante, dans l'enveloppe (Ohlrogge and Browse, 1995) (Figure B 2, flèche 3). Cette question n'est actuellement pas complètement résolue, mais on considère que l'import d'AP se ferait par le complexe TGD entre le système endomembranaire et l'OEM (Awai et al., 2006; Benning, 2009; Dubots et al., 2012; Wang et al., 2012). Dans un scénario possible, l'AP eucaryote est ensuite substrat pour une PAP plastidiale (Figure B 2) qui catalyse la production de diacylglycérol (Figure B 2, flèches 3 et 5). Un transport de DAG eucaryote est également envisageable, du système endomembranaire au chloroplaste (Figure B 2, flèche 4) et entre l'IEM et l'OEM (Figure B 2, flèche 6) (Boudiere et al., 2012).

5. Synthèse de glycérolipides dans l'enveloppe plastidiale

Qu'ils soient d'origine procaryote ou eucaryote, l'AP et le DAG sont ensuite les précurseurs pour l'ensemble des glycérolipides synthétisés dans le plaste, (Figure B 2, voie c) suivant deux voies:

- dans une première branche, l'AP est précurseur pour la synthèse de CDP-DAG, lui-même précurseur pour la synthèse du PG;
- dans une seconde branche, le DAG est le précurseur commun des galactolipides et du sulfolipide.

Nous détaillons ci-dessous le cas particulier des glycolipides.

a) Synthèse du MGDG

Les monogalactosyldiacylglycérol synthases catalysent le transfert d'un groupement galactosyl provenant de l'uridine diphospho-galactose en position *sn*-3 du DAG. Chez *Arabidopsis thaliana*, une famille multigénique de MGDG synthases est constituée de 2 types d'enzymes différant selon leurs séquence N-terminale : les MGDG synthases de type A qui présentent une partie N-terminale d'environ 100 acides aminés, ayant les particularités d'un peptide de transit chloroplastique, et les MGDG synthases de type B ayant une partie N-terminale beaucoup plus courte (Awai et al., 2001). En combinant la caractérisation des activités enzymatiques *in vitro*, les analyses des fractions subcellulaires des membranes du chloroplaste (Miege et al., 1999) et la détermination de la localisation subcellulaire à l'aide de protéines fusionnées à la green fluorescent protein (GFP), visualisées par microscopie épifluorescence (Awai et al., 2001), il a été montré que les MGDG synthases étaient situées dans l'enveloppe plastidiale et que MGD1 était la plus active et la plus abondante. Concernant la topologie membranaire, MGD1 est insérée de façon monotopique au niveau de l'IEM du chloroplaste et fonctionne sous forme d'homodimère en utilisant aussi bien le DAG eucaryote que procaryote (Miege et al., 1999; Nishiyama et al., 2003). Par l'étude de mutants (Jarvis et al., 2000; Kobayashi et al., 2006; Kobayashi et al., 2007) (voir ci-dessous), il a été montré que MGD1 était essentielle pour la biogenèse des thylacoïdes. Du fait que l'UDP-Gal n'était pas détectable dans le stroma des plastes par analyses en résonance magnétique nucléaire (RMN), il a été initialement proposé que MGD1 soit localisée au niveau de l'espace intermembranaire du chloroplaste (Figure B 2, flèche 7) (Miege et al., 1999). Une étude plus récente a montré qu'une épimérase catalysant la conversion de l'UDP-Glucose (UDP-Glc) en UDP-Gal au niveau du chloroplaste du riz, était essentielle pour la biosynthèse des galactolipides (Li et al., 2011). La mutation de son homologue (At2g39080) chez *Arabidopsis* est embryon-létale. Il est donc possible qu'At2g39080 permette la production d'UDP-Gal dans le stroma des plastes d'*Arabidopsis* et que la localisation initialement proposée pour MGD1

soit erronée. Parmi les 3 MGDG synthèses, MGD1 s'avère aussi la plus importante pour le développement et le fonctionnement de la plante. En effet, une mutation knockdown de *MGD1* chez *Arabidopsis* (mutants *mgd1-1*) (Jarvis et al., 2000), présentant une forte diminution du taux d'ARNm de MGD1 (~75%) et une diminution de l'expression protéique de MGD1 proche de 40%, perturbe la photosynthèse avec une réduction de la teneur en chlorophylle d'environ 50% conduisant à une détérioration du chloroplaste avec moins de membranes thylacoïdiennes. Le phénotype associé se traduit par des feuilles chlorotiques. Le mutant invalidé pour le gène *MGD1*, appelé *mgd1-2*, est létal en absence de substrats carbonés (Kobayashi et al., 2006; Kobayashi et al., 2007). Les graines du mutant *mgd1-2*, peuvent germer en présence de saccharose. Les plantules qui se développent dans ces conditions présentent une forte diminution du niveau de DGDG, ce qui indique que MGD1 a un rôle important pour la constitution du pool principal de DGDG. Le mutant *mgd1-2* présente un phénotype albinos, avec une disruption des membranes photosynthétiques conduisant au dysfonctionnement de la photosynthèse. Ces informations mettent ainsi en évidence l'importance de la synthèse des galactolipides non seulement dans la photosynthèse, mais aussi dans le développement de la plante (Kobayashi et al., 2007).

Les MGDG synthèses de type B sont localisées dans les tissus non photosynthétiques, c'est-à-dire les inflorescences ou encore les racines au niveau de l'OEM et opèrent en carence de phosphate (Awai et al., 2001; Kobayashi et al., 2009). Les mutants *mgd2*, *mgd3* et *mgd2 X mgd3* ne présentent pas de phénotype particulier dans des conditions standard de croissance (Kobayashi et al., 2009), suggérant que la plus grande proportion de MGDG est produite par l'action de MGD1.

Le MGDG néoformé peut être transporté dans les membranes thylacoïdiennes après avoir subi plusieurs désaturations par les désaturases FAD5, FAD6, FAD7 ou encore FAD8 (Figure B 2, flèche 9, 10 et 11) ou servir de substrat pour la synthèse du DGDG.

b) Synthèse du DGDG

Le second lipide majeur des membranes du chloroplaste chez *Arabidopsis*, le DGDG, est synthétisé à partir du MGDG principalement d'origine eucaryote par l'action des DGDG synthèses (DGD1 et DGD2) (Kelly et al., 2003; Benning, 2009). DGD1 et DGD2 possèdent une partie C-terminale de type glycosyltransferase, et DGD1 se distingue par la présence d'un domaine N-terminal de fonction inconnue (Kelly and Dormann, 2002; Kelly et al., 2003).

Dans les tissus photosynthétiques, la composition du MGDG et du DGDG est différente, avec une proportion importante d'AG en C16:3 pour le MGDG tandis que le DGDG a une proportion importante d'AG en C16:0. Ceci est dû aux différences d'affinités des enzymes impliquées dans la synthèse des galactolipides pour certains acyls. En effet la structure en acyls du MGDG est principalement composée de C16:3 et de C18:3, indiquant que le MGDG néosynthétisé (C18:1/C16:0) est rapidement désaturé par FAD5, puis par FAD7/8, produisant du MGDG polyinsaturé (C18:3/C16:3). Par contraste, le DGDG essentiellement composé de C16:0 en position *sn*-1 (C16:0/C18:3), indiquant qu'il existe une bifurcation dans l'utilisation du MGDG entre DGD1/DGD2 et FAD5. De plus, DGD1 présente une affinité plus importante pour le MGDG C18/C18 et DGD2 pour le MGDG en C16/C18 (Kelly et al., 2003). La composition en acyls des galactolipides peut être également différente selon les tissus et les conditions environnementales. Par exemple, les MGDG synthèses de type B ont une affinité plus importante pour le DAG eucaryote de composition C18:2/ C18:2 que pour le DAG procaryote C18:1/C16:0 (Awai et al., 2001). Ceci explique la grande proportion du MGDG eucaryote dans les tissus non photosynthétiques et le fait que le DGDG soit principalement de structure eucaryote en carence de phosphate.

Plusieurs mutants des gènes codant pour les DGDG synthèses ont été étudiés. Dans le mutant *dgd1* chez lequel l'expression du gène *DGD1* est totalement invalidée, une diminution d'environ 90% du DGDG est observée (Dormann et al., 1995). La croissance du mutant *dgd1* est fortement affectée et la photosynthèse est altérée. Par contraste les mutants *dgd2-1* et *dgd2-2*, invalidés au niveau du gène *DGD2*, ne présentent aucun phénotype dans les conditions standard de culture (Kelly et al., 2003). De manière intéressante, le double mutant *dgd1* x *dgd2* présente un phénotype plus marqué que le mutant *dgd1*. Le DGDG résiduel dans le double mutant semblerait provenir d'une voie de synthèse alternative, par l'action d'une galactolipide:galactolipide galactosyltransferase (voir ci-dessous).

c) Processus de canalisation (ou "chanelling") dans la synthèse du MGDG et du DGDG

L'analyse des mutants *mgd* et *dgd* est cohérente avec une coopération entre certaines MGDG synthèses et DGDG synthèses, peut-être par contacts physiques, conduisant à une canalisation entre intermédiaires métabolique entre chaque enzyme, processus appelé en anglais "chanelling", en particulier suivant le schéma [DAG → MGDG → DGDG].

Au niveau de l'OEM, DGD1 semblerait en particulier prendre en charge les produits issus de MGD1 situé dans l'IEM, sans qu'il y ait une interaction directe entre les 2 protéines (Froehlich et al., 2001). DGD2 prendrait en charge les produits générés par MGD2 et MGD3 dans des conditions particulières telles que la carence en phosphate (Figure B 2) (Benning and Ohta, 2005; Benning, 2009). Sachant que les DGDG synthèses sont localisées au niveau de l'OEM, un transport du MGDG de l'IEM vers l'OEM est nécessaire (Figure B 2, flèche 8).

d) Voie alternative de synthèse d'oligo-galactoglycérolipides (DGDG, tri-GDG, tétraGDG)

Lors d'un stress au froid ou lors d'une exposition à l'ozone, une voie alternative permet la synthèse de DGDG, par transfert de galactose catalysé par une galactolipide:galactolipide galactosyltransferase (GGGT) (Van Besouw et al., 1981; Heinz and Roughan, 1983; Heemskerk et al., 1986). Cette activité enzymatique est restée très longtemps non caractérisée sur le plan moléculaire. Des travaux récents au laboratoire de Christoph Benning ont permis de résoudre cette question et montré que la GGGT était codée par le gène Sensitive to freezing 2 (*SFR2*) (Moellering et al., 2010; Moellering and Benning, 2011). La tête polaire galactosylée du MGDG est transférée sur un autre galactolipide, produisant ainsi du DAG, du DGDG, mais aussi du tri-GDG ou encore du tétra-GDG. Le DAG produit peut être incorporé dans la synthèse des triacylglycérols (TAGs) au niveau de l'enveloppe du plaste. Ce mécanisme permettrait de compenser les variations de volumes des organites et stabiliseraient les membranes durant l'exposition au froid (Moellering et al., 2010).

e) Synthèse du SQDG

La synthèse du sulfolipide est également située au niveau de l'enveloppe du chloroplaste. La formation de la tête polaire sulfatée est initiée par la sulfolipide synthase SQD1, qui catalyse la formation de l'UDP-sulfoquinovose (UDP-Sq) à partir d'UDP-Glucose (Moreau et al., 1998; Sanda et al., 2001). L'UDP-Sq est ensuite transféré sur un DAG par SQD2 pour donner du SQDG (Yu et al., 2002) au niveau de l'IEM (Tietje and Heinz, 1998). Le SQDG porte essentiellement un AG C16:0 en position *sn*-1 et C18:2 ou C18:3 en *sn*-2. En carence de phosphate, la production de SQDG est stimulée et ce lipide se substitue au PG

dans les membranes thylacoïdiennes, conservant la charge négative nette de ce phospholipide (Essigmann et al., 1998). Le mutant *sqd2* présente une perturbation de la croissance et une altération modérée de la photosynthèse (Yu and Benning, 2003).

6. Molécules dérivées des galactolipides

Comme indiqué plus haut, les groupements acyls du MGDG peuvent être désaturés par l'action de FAD5, FAD6, FAD7 et FAD8, donnant ainsi des AG polyinsaturés (C16:2, C16:3, C18:2, C18:3) (en anglais "polyunsaturated fatty acids" ou PUFAs). Ceux-ci peuvent être libérés du MGDG et stockés dans les TAGs à l'intérieur du plaste (Youssef et al., 2010) (Figure B 2, flèche 13 et 14). Les PUFAs peuvent être oxygénés par l'action d'une lipoxygénase plastidiale (LOX) (Andreou and Feussner, 2009). Sous l'action de la LOX, le C16:3 donne alors de l'acide dinor-oxo-phytodiénoïque (dnOPDA) et le 18:3 de l'acide oxo-phytodiénoïque (OPDA), qui seront ensuite exporté vers le péroxysome. OPDA et dnOPDA sont les précurseurs des oxylipines, incluant l'acide jasmonique (Figure B 2, flèche 16). Alternativement, le MGDG peut être directement lié à de l'OPDA ou à du dnOPDA, au lieu d'AG non oxygénés, formant une structure cyclo-oxylipine-galactolipide, appelée également "arabidopside" (Andreou and Feussner, 2009) (Figure B 2, flèche 15). Ces composés s'accumulent dans des conditions particulières telles qu'à la suite d'attaques par des pathogènes ou lors de blessures. Des études récentes de plusieurs équipes indépendantes montrent qu'il existe une grande diversité moléculaire de galactolipides liés aux oxylipines, détectables par spectrométrie de masse (Ibrahim et al., 2011; Vu et al., 2012).

III. Etude de l'homéostasie glycérolipidique en combinant l'analyse de réponses à de stress environnementaux, avec des analyses transcriptomiques et génétiques

1. Grands principes définissant l'homéostasie glycérolipidique membranaire dans la cellule végétale

Dans les cellules eucaryotes, chaque compartiment cellulaire a une composition en lipide spécifique qui est finement régulée par de nombreux mécanismes, afin de tendre vers un état stationnaire. L'ensemble des mécanismes de régulation de ce système à l'état d'équilibre est appelé *homéostasie* lipidique. En combinant l'ensemble des études réalisées chez *Arabidopsis*, il apparaît que les principales caractéristiques de l'homéostasie lipidique consistent

- dans le contrôle du rapport MGDG/DGDG et SQDG/PG au niveau des membranes du chloroplaste;
- dans le contrôle de la balance galactolipide/phospholipide au niveau de la cellule végétale.

Les proportions relatives de MGDG, DGDG, de PG et de SQDG sont importantes pour l'architecture membranaire des thylacoïdes. En effet, la tête polaire du MGDG étant de petite taille, la molécule a une forme conique et forme spontanément une phase micellaire de type "hexagonale II" qui déstabilise les membranes *in vitro* en solution aqueuse (Gounaris and Barber, 1983; Webb and Green, 1991) et induit des courbures (Bruce, 1998). Le DGDG a une forme cylindrique qui favorise les phases lamellaires, stabilisant ainsi les membranes thylacoïdiennes *in vitro* en solution aqueuse (Gounaris and Barber, 1983; Holz and Dormann, 2007). Le rapport MGDG/DGDG influe donc sur la forme des thylacoïdes, et la régulation de leurs proportions relatives est donc un aspect important du métabolisme lipidique des cellules chlorophylliennes (Shimajima and Ohta, 2011).

Le SQDG et le PG ont une forme cylindrique, ce qui leur confère une propriété stabilisatrice des membranes. De plus, le SQDG et le PG sont chargés négativement, ce qui influe sur les propriétés physico-chimiques des membranes et favorise l'interaction avec des protéines (Loll et al., 2007). En carence de phosphate, le niveau de PG dans les membranes photosynthétiques diminue significativement, ce qui est compensé par une augmentation de SQDG (Benning et al., 1993; Yu and Benning, 2003). La proportion de PG est donc inversement corrélée à celle du SQDG. Des approches génétiques bloquant la synthèse de PG chez *Arabidopsis* ont montrées qu'une absence totale de PG dans le chloroplaste était létale (Xu et al., 2006). Un niveau faible de PG dans les chloroplastes induit une perturbation de la croissance et une photosynthèse altérée (Yu and Benning, 2003). Ces phénotypes sont accentués lorsque l'interruption de la synthèse de PG est combinée avec l'interruption de la synthèse du SQDG (Yu and Benning, 2003).

La proportion de MGDG, de DGDG, de PG et de SQDG est donc fortement régulée, selon le contexte environnemental et physiologique de la plante (Boudiere et al., 2013). De plus, ces glycérolipides sont associés spécifiquement avec des complexes protéiques, incluant les photosystèmes, et sont essentiels pour les structurer (Loll et al., 2007; Mizusawa and Wada, 2012). Ces lipides ont été en particulier identifiés comme de possible co-facteurs impliqués dans la photosynthèse en se basant sur i) des études cristallographiques surtout réalisées chez des modèles cyanobactériens, combinées avec ii) des caractérisations biochimiques d'extraits de lipides de lipides à partir de fractions purifiées (Loll et al., 2007; Mizusawa and Wada, 2012). Il semblerait que l'interaction de MGDG, DGDG, PG et SQDG soient plus importante avec le photosystème de type II (PSII) (pour revue (Boudiere et al., 2013)).

L'établissement et le maintien des équilibres MGDG/DGDG, SQDG/PG et galactolipide/phospholipide, nécessitent un trafic lipidique dynamique alimentant les différents sites de synthèse lipidiques en précurseurs, localisés au niveau de différents organites. Par exemple, les glycérolipides provenant du RE étant utilisés pour la synthèse des galactolipides, un transfert de lipides du RE vers le chloroplaste est nécessaire (Figure B 5, processus 3).

Les machineries de transfert de lipides sont mal connues. Ci-dessous nous listons brièvement les différents types de machineries et de systèmes possibles, au sein d'une même membrane et entre différentes membranes.

Dans les cellules eucaryotes, des mouvements de lipides peuvent avoir lieu *au sein d'une membrane*. Des mouvements peuvent se produire de manière transversale à la membrane, d'un feuillet à l'autre, soit par diffusion, soit par l'action de transporteurs lipidiques (Figure B 5, processus 2). Des transporteurs ATP-dépendants, comme les transporteurs ABC ou les ATP-ases de type P4 encore appelées flippases, effectuent ainsi un transport actif de lipide en opposition au processus de diffusion généré par un gradient de concentration. Ils permettent de créer et de maintenir une répartition asymétrique des lipides de part et d'autre de la membrane. Ces transporteurs sont en particulier importants pour le trafic vésiculaire mais les mécanismes exacts sont encore mal définis: l'activité de ces transporteurs pourrait induire une courbure membranaire favorisant l'initiation du bourgeonnement et/ou activer des enzymes nécessaires à la formation de la vésicule (Devaux et al, 2008).

Il existe différents types de transports possibles *entre membranes*. Un premier système suit simplement le trafic vésiculaire, qui joue un rôle central dans le transport de protéines membranaires, ainsi que de lipides, dans la voie de sécrétion passant par l'appareil de Golgi (Figure B 5, processus 1a) (van Meer et al., 2008). Il n'y a dans ce cas pas d'extraction du lipide en dehors de son contexte membranaire initial pour être inséré dans le contexte membranaire final. Le mécanisme associé à ce transport est basé sur le bourgeonnement de la membrane formant des vésicules. Des études sur l'ultrastructure des organites et l'utilisation d'inhibiteurs du transport vésiculaire ont amené à penser que les thylacoïdes seraient formés par ce bourgeonnement de l'IEM par l'action de VIPP1 (vesicle-including protein in plastids), une protéine identifiée chez *Arabidopsis* et la cyanobactérie *Synechocystis* (Figure B 5, processus 1b) (Kroll et al., 2001; Westphal et al., 2001). Ce rôle a été initialement soutenu par le fait que l'inactivation du gène *VIPP1* chez *Arabidopsis* empêchait la biogenèse des thylacoïdes (Westphal et al., 2001). Cependant, le rôle de VIPP1 dans le bourgeonnement des vésicules, leurs trafics et leurs fusions avec les thylacoïdes n'a pas pu être démontré de façon précise. Une étude récente chez la cyanobactérie a montré que les dommages initiaux causés par la déplétion de *VIPP1* n'était pas directement dus à une perte des membranes thylacoïdiennes, mais plutôt à la perte de VIPP1 en lui-même (Gao and Xu, 2009). Une autre étude a montré que VIPP1 était une protéine multifonctionnelle importante pour la maintenance de l'enveloppe (Zhang et al., 2012). Ensemble, ces études suggèrent donc que VIPP1 pourrait influencer sur les thylacoïdes aussi bien que sur les membranes de l'enveloppe,

mais qu'il n'est pas directement impliqué dans la biogénèse des membranes thylacoïdiennes (Zhang and Sakamoto, 2012).

Dans la plante, plusieurs **zones de contacts** entre le RE et d'autres compartiments cellulaires tels que la membrane plasmique, l'enveloppe nucléaire, la vacuole, la mitochondrie et le chloroplaste ont pu être identifiés (Staehelin, 1997; Levine and Loewen, 2006; Jouhet et al., 2007; Benning, 2008) (Figure B 5, processus 3). La synthèse de lipides plastidiaux nécessite le transport de précurseurs comme l'AP du RE au chloroplaste (Dubots et al., 2012). La forte interaction physique entre le RE et le chloroplaste a pu être démontrée par manipulation optique (Andersson et al., 2007) et pourrait permettre le transport d'AP par un transporteur multiprotéique particulier appelé TGD (Wang et al., 2012). La découverte de ce système de transport provient d'un criblage génétique visant à isoler des mutants altérés au niveau du profil galactolipidique, et dont la caractérisation fonctionnelle a montré un défaut d'import de précurseurs eucaryotiques vers le chloroplaste (Xu et al., 2003) (Figure B 5, processus 2 et 3). Les mutants, ainsi que les gènes sous-jacents porteurs des mutations, ont été nommés *tgd* car le phénotype correspondant était caractérisé par l'accumulation de trigalactosyldiacylglycérol (TGDG) et d'autres oligo-galactolipides produits par la galactolipide:galactolipide galactosyltransférase (GGGT), cette enzyme étant activée lorsque l'interaction RE-plaste est détériorée (Xu et al., 2003; Moellering et al., 2010). Quatre loci ont ainsi été identifiés. Trois d'entre eux, *TGD1*, *TGD2* et *TGD3*, codent pour des composants d'un transporteur de type ABC, contenant un domaine de liaison à l'ATP. Le quatrième gène, *TGD4*, code pour une protéine du RE liée à l'OEM (Xu et al., 2008; Benning, 2009; Wang et al., 2012). L'inactivation génétique de ce transporteur ABC putatif bloque le trafic lipidique entre le RE et le plaste (Xu et al., 2003). Un motif de liaison à l'AP a été caractérisé au niveau de la sous-unité TGD2 et a été proposé comme responsable du transfert de l'AP vers l'enveloppe (Benning, 2008, 2009; Roston et al., 2012). Par ailleurs, TGD4 possède un site de liaison à l'AP. TGD4 se lie à l'OEM sous forme d'homodimère (Wang et al., 2013) au niveau de zones de contact (Wang et al., 2012). La structure de TGD4 étant en tonneau β , cette sous-unité du complexe TGD pourrait assurer un transport de type "chanelling" de l'AP entre le RE et le plaste.

Dans des conditions particulières telle que la carence de phosphate, la chute du niveau des phospholipides est compensée par un export de DGDG du chloroplaste vers les membranes non plastidiales (Härtel et al., 2000). Cet export pourrait aussi s'opérer par des zones de contacts vers la membrane plasmique (Andersson et al., 2003; Andersson et al.,

2005), la mitochondrie (Jouhet et al., 2004) et le tonoplast (Andersson et al., 2005) (Figure B 5, processus 3). Ce système de transfert reste néanmoins à être caractérisé.

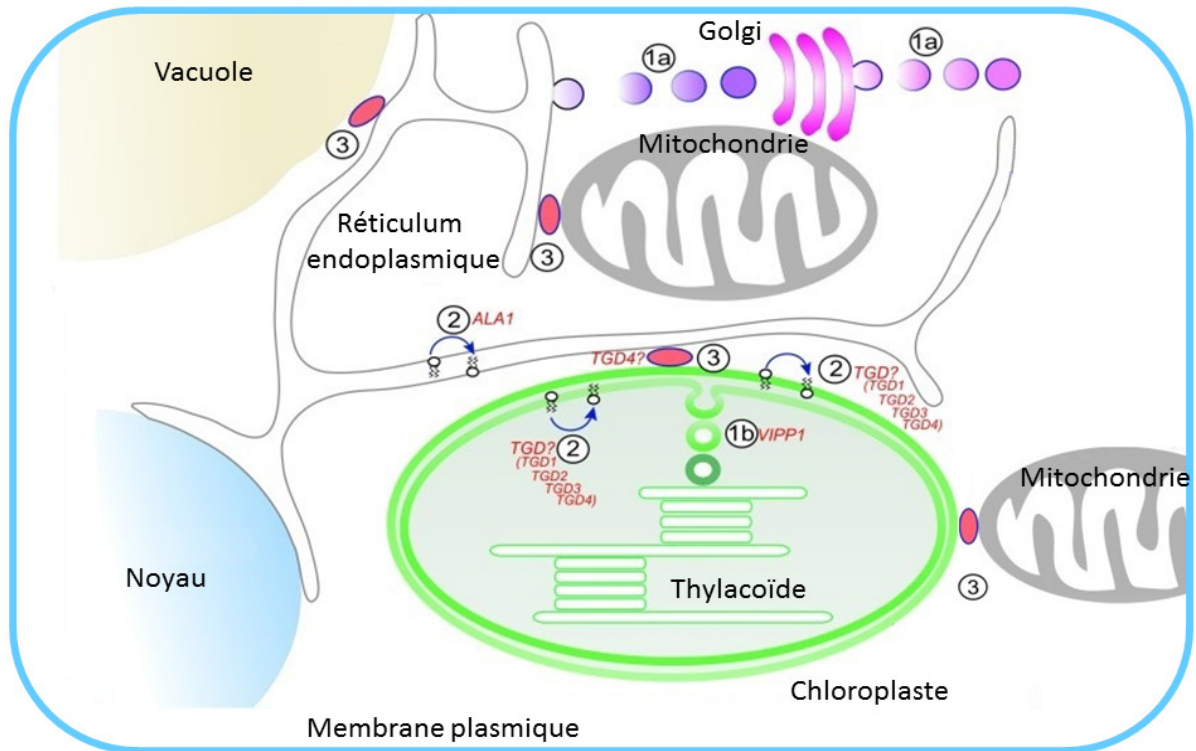


Figure B 5 : Schéma des processus de transport des lipides chez *Arabidopsis thaliana*. **Processus 1.a)** Un mécanisme par une voie vésiculaire est proposé pour le trafic des protéines membranaires et certains lipides entre les organites suivant la voie sécrétrice. **Processus 1.b)** Le transfert vésiculaire de lipides de l'IEM vers les thylacoïdes par VIPP1, récemment remis en cause par de nouvelles études. **Processus 2)** Transfert lipidique d'un feuillet à l'autre de la membrane par des flippases énergie-dépendantes. **Processus 3)** Transfert de lipides par des zones de contact entre les plastides, le RE, les mitochondries et les vacuoles. Abréviations: ALA1, aminophospholipid ATPase; TGD1, TGD2 TGD3 et TGD4, complexe "trigalactosyldiacylglycérol"; VIPP1, vesicle-including protein in plastids. Figure modifiée d'après (Li-Beisson et al., 2013).

En combinant tous ces mécanismes, la composition lipidique des membranes ainsi que leurs propriétés peuvent être ajustées en réponse aux changements environnementaux (disponibilité de certains nutriments tels que le phosphate, exposition à la lumière, au froid, à la chaleur ou encore à des stress hydriques), à l'état physiologique de la plante (croissance, développement foliaire, floral, etc.), ou à des agents biotiques (attaque de pathogènes ou encore blessures par des herbivores). L'état stationnaire peut alors être modifié, favorisant ainsi l'adaptation de la plante. De multiples mécanismes de régulations sont mis en place permettant d'atteindre ces nouveaux équilibres.

2. Perturbation du système glycérolipidique par la carence de phosphate

La recherche de composants du système glycérolipidique membranaire et particulièrement de ceux impliqués dans la génération et l'import des intermédiaires eucaryotes du RE vers la production de MGDG, a bénéficié des analyses des effets de la carence en phosphate, puisque ce stress naturel provoque un remodelage lipidique membranaire spectaculaire à l'échelle de la cellule. En utilisant des analyses lipidomiques de cellules d'*Arabidopsis* cultivées dans un milieu supplémenté avec différentes concentrations de Pi, il a ainsi été montré que la carence de phosphate provoquait une accumulation de PC transitoire, suivie de son hydrolyse et de la conversion de la partie non phosphatée résiduelle en galactolipides, suivant la voie eucaryotes (Jouhet et al., 2003). L'analyse de données transcriptomiques issues de plantes entières d'*Arabidopsis* cultivées sur des concentrations faibles de Pi (Misson et al., 2005; Morcuende et al., 2007), combinée à des études génétiques, ont permis d'identifier plusieurs gènes codant pour des PLD (PLD ζ 1 et PLD ζ 2) et des PLC (Nakamura et al., 2009). Les mutants de ces phospholipases présentent des phénotypes cohérents avec un blocage de l'approvisionnement en précurseurs eucaryotes vers la synthèse de MGDG (Jouhet et al., 2007; Benning, 2009; Jouhet et al., 2010) (Figure B 2). Une première possibilité est que l'AP produit par les PLDs soit transféré au travers de l'enveloppe du plaste par le transporteur TGD (Figure B 2, Figure B 5, processus 2) (Benning, 2009). Après être acheminé jusqu'à l'IEM, l'AP pourrait être ensuite déphosphorylé par une PAP et générer ainsi du DAG. Le transport d'autres phospholipides par le transporteur TGD est aussi envisageable (Roston et al., 2011). Une alternative mentionnée plus haut est que le DAG produit par les PLC ou les PAP endomembranaires (Nakamura et al., 2009) soit directement transporté à l'enveloppe du plaste par un mécanisme encore inconnu (Figure B 2).

Lors d'une carence en phosphate, nous avons aussi précédemment mentionné que le DGDG était exporté spécifiquement vers des compartiments extra-plastidiaux, incluant la membrane plasmique, le tonoplaste et l'enveloppe de la mitochondrie (Härtel et al., 2000; Andersson et al., 2003; Jouhet et al., 2004; Andersson et al., 2005). Le DGDG pourrait ainsi se substituer aux phospholipides, en particulier la PC (Jouhet et al., 2007; Benning, 2008; Tjellstrom et al., 2008; Benning, 2009). Ce DGDG serait exporté au niveau de zones de contact entre le chloroplaste et la mitochondrie (Jouhet et al., 2004). L'export de DGDG en dehors des membranes plastidiales a été démontré par marquage (immunofluorescence) avec

des anticorps anti-DGDG, par immuno-agglutination dans le cas des mitochondries purifiées à partir de cellules d'*Arabidopsis* cultivées en carence de Pi et par analyse directe du DGDG par RMN sur des fractions mitochondriales purifiées (Figure B 6), (Jouhet et al., 2004). Jusqu'à présent, aucun composant impliqué dans l'export du DGDG n'a été caractérisé.

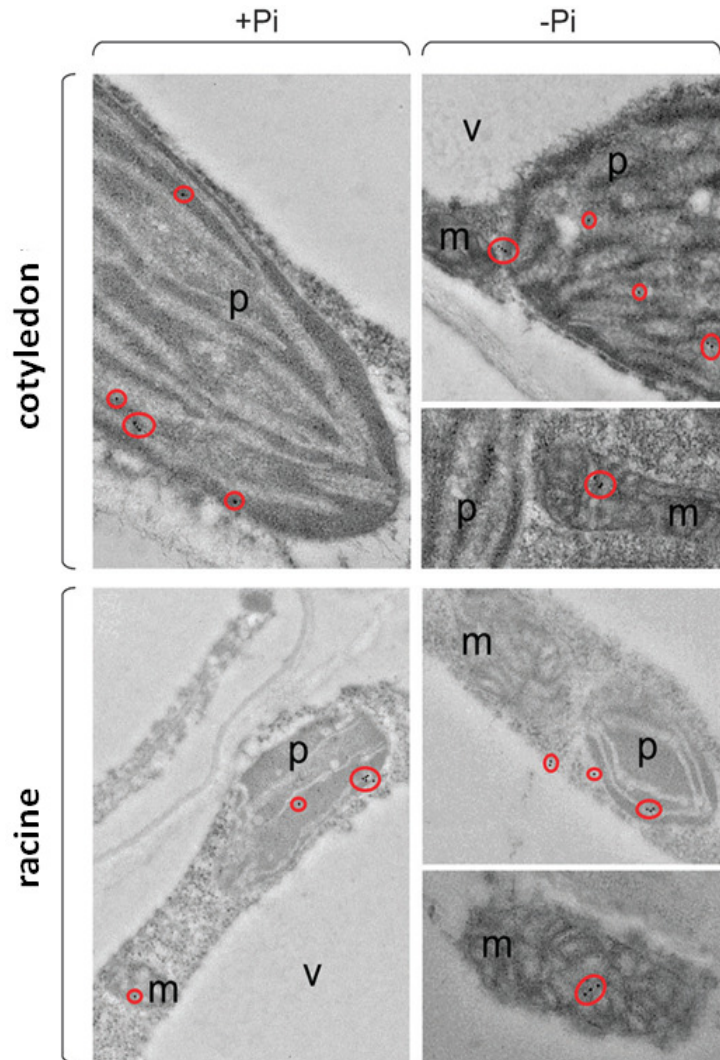


Figure B 6 : Immunolocalisation du DGDG dans les plastes et les mitochondries de cellules d'*Arabidopsis*. Immunodétection avec des anticorps liés à des billes d'or du DGDG dans les cotylédons et les racines d'*Arabidopsis* cultivées 4 jours en présence (+Pi) ou en absence de Pi. Dans les cellules photosynthétiques des cotylédons et dans les milieux + Pi, le DGDG est détecté uniquement au niveau des membranes du chloroplaste (cerclés de rouge). En milieu – Pi, le DGDG est détecté également dans les mitochondries. Dans les racines de plantes cultivées sur milieu + Pi, le DGDG est détecté non seulement dans le plaste (ici un amyloplaste) mais aussi dans la mitochondrie. Il existe donc un transfert constitutif de DGDG à cet organelle même sans carence de Pi. En – Pi dans les racines, le transfert semble s'intensifier. v, vacuole (Boudiere et al., 2012).

3. Couplage métabolique des phospholipides et des galactolipides grâce à l'activation de MGD1 par l'acide phosphatidique

Des travaux d'enzymologie réalisés au laboratoire ont permis de proposer un mécanisme possible pour initier un remodelage rapide des glycérolipides en carence de Pi, précédant toute modification d'expression des enzymes de synthèse des galactolipides (Dubots et al., 2010; Dubots et al., 2012). Il s'agirait de l'activation de la synthèse de MGDG induite par une chute de phospholipides. Sachant qu'en carence de Pi, plusieurs PLDs et PLCs sont sur-exprimées et que ces lipases produisent des molécules connues pour jouer parfois un rôle de signalisation, l'AP et le DAG, un rôle de couplage a été recherché pour ces intermédiaires lipidiques. Les transporteurs TGD peuvent transférer l'AP, qui pourrait jouer le rôle de précurseur important de la synthèse des galactolipides, du RE à l'IEM, proposé par l'équipe de Christophe Benning (Benning, 2009) et/ou un rôle de molécule signal, activatrice. Il a été en effet montré que l'enzyme MGD1 d'*Arabidopsis*, sous forme native ou recombinante, était fortement activée par de faibles proportions de PA (Dubots et al., 2010; Dubots et al., 2012). La modélisation tridimensionnelle de MGD1 (Botte et al., 2005) montre de plus que certains amino-acides interagiraient avec l'AP et d'autres lipides (Dubots et al., 2010). Les études structurales plus profondes et les analyses fonctionnelles dans des modèles membranaires reconstitués *in vitro* sont requises pour caractériser le mécanisme moléculaire par lequel l'AP modifie l'activité de MGD1.

IV. Etude de l'homéostasie lipidique en utilisant une nouvelle molécule chimique, la galvestine-1

1. La découverte de la galvestine-1 et de son mode d'action

Nous avons vu précédemment que l'enzyme MGD1 était un point de couplage possible entre la synthèse des phospholipides et des galactolipides, ce qui en fait une cible intéressante pour des études à l'aide de petites molécules. En effet, un inhibiteur efficace de l'activité de MGD1 serait un outil qui permettrait d'étudier l'homéostasie lipidique chez *Arabidopsis*, en perturbant le système au niveau de ce point de couplage. De nouveaux acteurs

ou de nouvelles voies pourraient ainsi être identifiés puis finement étudiés, par une stratégie dite de génétique chimique. Cette stratégie combine l'utilisation de la molécule chimique chez des plantes sauvages mais aussi chez des mutants. Un des avantages comparés à un KO des MGDG synthases, est que l'on peut s'affranchir des problèmes de létalités (comme pour le gène *MGD1*) ou viser à l'aide d'une molécule touchant toutes les MGDG synthases, contourner les problèmes de compensations classiques en génétique des familles multigéniques. On peut de plus moduler cette inhibition en faisant varier les proportions de la molécule inhibitrice. Ce type d'outil permet de faire ressortir des mécanismes liés à une sensibilité pour une certaine quantité de substrat, des senseurs. C'est en partie dans cette optique que notre équipe a cherché à identifier un inhibiteur efficace des MGDG synthases.

De nombreux inhibiteurs de MGDG synthases avaient été décrit (Tableau B 1) mais aucun n'était assez sélectif ou actif pour être utilisé pour une stratégie de génétique chimique. Ces inhibiteurs comprennent des compétiteurs non-spécifiques, par exemple l'UDP qui entre en compétition avec l'UDP-Gal, ou des composés réagissant avec des amino-acides exposés à la périphérie de la protéine.

Afin d'identifier de nouvelles molécules, dans un premier temps, un test enzymatique miniature et robuste de la synthèse de MGDG a été développé pour permettre un criblage à haut débit automatisé (Nishiyama et al., 2003). Des inhibiteurs de l'enzyme MGD1 d'*Arabidopsis* ont ensuite été sélectionnés par criblage de 23.360 petites molécules (Botte et al., 2011). La structure active a été optimisée à partir de 250 analogues synthétisés, puis évalués sur l'enzyme *in vitro* et plantes entières, *in vivo*. La molécule qui présentait une activité optimale à la fois *in vivo* et *in vitro* a été retenue pour les études subséquentes et appelée galvestine-1 (Botte et al., 2011) (Tableau B 1, Figure B 7).

Partie bibliographique

Composé	Inhibition de l'activité enzymatique de MGDG <i>in vitro</i>	Mode d'action	Spécificité
UDP, pH 7.8	Ki relatif à l'UDP-Gal = 23 μ M ($K_{mUDP-Gal} = 100 \mu$ M)	Compétition avec l'UDP-Gal ($K_i = 0.23 \times K_{mUDP-Gal}$)	Enzymes manipulant des nucléotides et des nucléotide-sucres
Cations métalliques libres : Zn²⁺ et Cu²⁺, pH 7.8	IC50 = ~0.1 mM (Zn ²⁺) ; ~0.5 mM (Cu ²⁺) ;	Pas d'inhibition à pH 6, indiquant que les cations bivalents se lient à des résidus histidines à la périphérie de la protéine. Réversible en présence d'agent chélatant hydrophile tels que l'EDTA, 2 mM.	Protéines présentant des histidines avec un rôle fonctionnel
Anhydride citraconique, pH 7.8	IC50 = ~ 10 μ M	Réaction covalente avec des amines primaires et des résidus α -lysyl, à la périphérie ou en position N-terminale des enzymes MGDs. Réversible à pH alcalin	Protéines présentant des lysines avec un rôle fonctionnel
N-Ethylmaléimide	IC50 < 8 μ M	Réaction covalente avec les groupements sulfhydryl présents au niveau des résidus cysteyle, à la périphérie de protéines. Inefficace en présence d'agents réducteurs tels que le dithiothreitol, 1 mM	Protéines présentant des cystéines avec un rôle fonctionnel
ortho-Phenanthroline	IC50 = ~ 0.1 mM	Agent chélatant de structure planaire, hydrophobe, réagissant avec des atomes métalliques requis pour l'activité des MGDG synthases. Réversible partiellement par addition d'une série de cations bivalents.	Protéines associées à des cations métalliques
S-Nitroso-N-acetylpenicillamine	IC50 = ~ 1.3 mM	Donneur d'oxyde nitrique, agissant par oxydation de métaux coordonnés à une protéine ou par nitrosylation d'un groupement sulfhydryl	Protéines sensibles au NO
Galvestine-1	Ki relatif au DAG = 0.235 mole fraction ($K_{mDAG} = 2.59$ mole fraction) ; IC50 de l'ordre du μ M	Compétition avec le DAG ($K_i = 11 \times K_{mDAG}$)	MGD1 MGD2 MGD3

Tableau B 1 : Inhibiteurs des MGDG synthases (van Besouw and Wintermans, 1979; Heemskerk et al., 1986; Coves et al., 1988; Marechal et al., 1995; Botte et al., 2011; Boudiere et al., 2012).

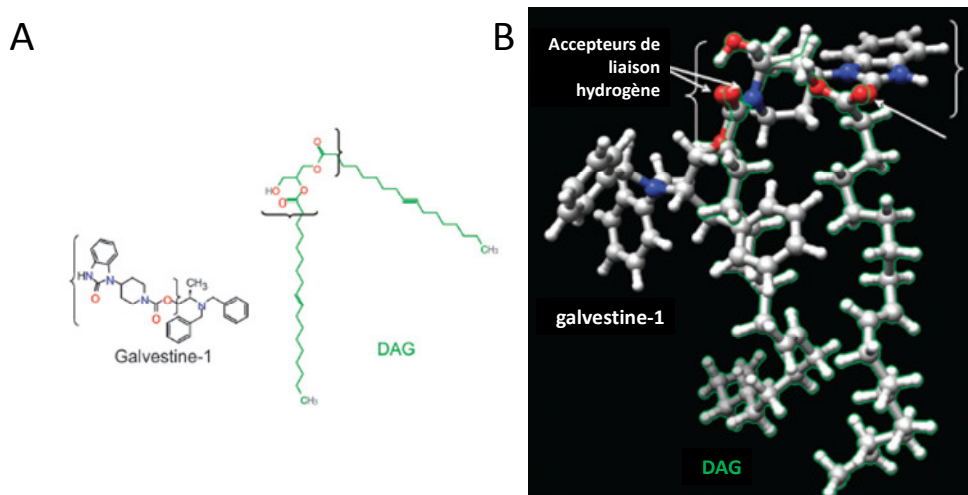


Figure B 7 : La galvestine-1, un inhibiteur spécifique de MGD1. A) Structures de la galvestine-1 et du DAG. La galvestine-1 contient le squelette (1,2-dihydro-2-oxobenzo[d]imidazol-3-yl)piperidine-1-carboxylate (indiqué entre crochets) qui interagit avec MGD1. La partie du DAG se liant aussi au MGD1 est indiquée entre crochets. **B) Superposition des structures tridimensionnelles de la galvestine-1 et du DAG.** Le DAG est entouré de vert.

La galvestine-1 agit par compétition avec le substrat DAG au niveau de son site de liaison à MGD1 (Botte et al., 2011). Le K_i relatif au DAG est 11 fois plus bas que le K_m mesuré pour le substrat DAG, ce qui indique que cet inhibiteur est particulièrement efficace. La modélisation des structures tridimensionnelles de la galvestine-1 et du DAG ont été réalisées par des techniques de dynamique moléculaire (Figure B 7, B). La superposition des accepteurs de liaisons hydrogènes, au niveau du glycérol du DAG et de la partie (1,2-dihydro-2-oxobenzo[d]imidazol-3-yl)piperidine-1-carboxylate de la galvestine-1 est peut-être responsable du mécanisme compétitif de l'inhibition (Figure B 7, B). Les parties interagissant avec MGD1 au niveau des 2 molécules présentent une grande similarité. A notre connaissance, la galvestine-1 est un rare cas d'inhibiteur compétitif du DAG, incluant les esters de phorbol, ayant un squelette distinct comparé à la structure acyl-glycérol.

La galvestine-1 inhibe toute la famille multigénique des MGDG synthases, soient MGD1, MGD2 et MGD3. Le traitement d'*Arabidopsis* avec de la galvestine-1 a donc permis l'analyse d'une condition qui n'a jamais pu être testée par des approches génétiques auparavant, c'est-à-dire en ciblant tous les membres de la famille multigénique des MGDG synthases dans le même fond génétique.

2. Effets de la galvestine-1 chez *Arabidopsis*

a) Effet de la galvestine-1 au niveau des feuilles

Le niveau de MGDG est modulé en fonction de la concentration de galvestine-1 ajoutée dans le milieu de culture de la plante, il s'agit d'un contrôle dose-dépendant (Botte et al., 2011). Les effets de la galvestine-1 sont visibles après 15 jours de culture, lorsque les nouvelles feuilles se sont développées. La sensibilité à la galvestine-1 chez *Arabidopsis* se caractérise par une réduction de la taille des plantules, qui comportent des feuilles chlorotiques (Figure B 8, A). A hautes doses, une chlorose sévère des plantules a lieu tandis qu'à doses plus faibles la chlorose est plus prononcée autour des tissus vasculaires, de façon cohérente avec le fait que l'introduction de la galvestine-1 dans la plante se fait au niveau de la racine et sa circulation dans le xylème et le mésophylle (Botte et al., 2011).

En microscopie électronique, des coupes du mésophylle de feuilles d'*Arabidopsis* cultivées sur milieu gélosé contenant de la galvestine-1 à 100 μM montrent une diminution de la taille des chloroplastes avec une réduction du nombre de thylacoïdes (Figure B 8, B). L'altération des chloroplastes pourrait expliquer le phénotype chlorotique des plantules traitées à la galvestine-1.

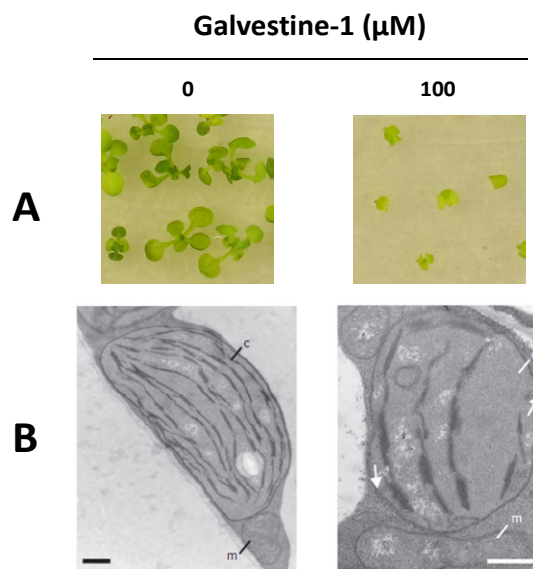


Figure B 8 : Effets de la galvestine-1 sur des plantes *Arabidopsis*. Les plantules ont été cultivées sur un milieu gélosé complété avec 0 μM (contrôle) ou 100 μM de galvestine-1. **A) Observation du phénotype au niveau de la plante entière.** Des plantules cultivées en présence de 100 μM de galvestine-1 sont caractérisées par des feuilles chlorotiques et une réduction de la taille. Echelle, 0.5 cm. **B) Observation du phénotype au niveau de chloroplaste de feuille d'*Arabidopsis*.** Observation en microscopie électronique de chloroplastes issus de tissus foliaires de plantes cultivées en présence de 100 μM de galvestine-1. Echelle, 0.5 μm ; c, chloroplaste ; m, mitochondrie, (Botte et al., 2011).

b) Effet de la galvestine-1 au niveau des racines

Les cellules des racines contiennent des plastides non photosynthétiques qui accumulent de l'amidon (amyloplastes). L'absence de thylacoïdes conduit à une teneur plus faible de ces tissus en galactolipides. Le patron d'expression des gènes *MGD1*, *MGD2*, *MGD3*, *DGD1* et *DGD2* montre que la synthèse racinaire du MGDG et du DGDG repose principalement sur *MGD3* (Awai et al., 2001) et *DGD2* respectivement. Les plantes traitées en présence de galvestine-1 présentent un fort phénotype au niveau de la racine. En effet, l'apex racinaire est plus fin et la coiffe racinaire est plus large en forme de « massue » (Figure B 9, A). Le nombre de poils absorbants est fortement diminué (non quantifié) et le développement de racines latérales est altéré (Botte et al., 2011) (Figure B 9, B). Ces observations nous permettent de déduire que la synthèse des galactolipides est essentielle au développement racinaire.

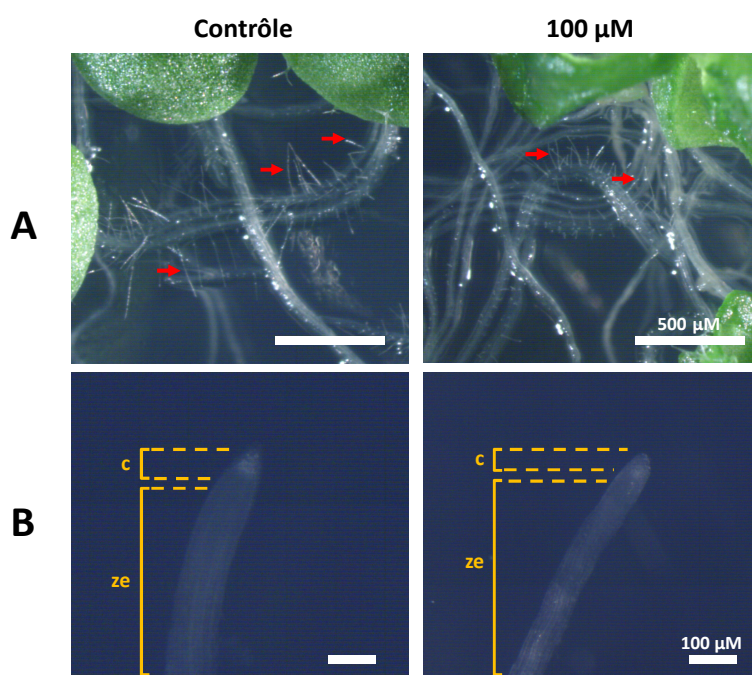


Figure B 9 : Effets de la galvestine-1 sur les racines d'*Arabidopsis*. Des plantules ont été cultivées sur un milieu gélosé complété avec 0 μM (contrôle) ou 100 μM de galvestine-1. **A) Diminution du nombre et de la taille des poils absorbant en présence de galvestine-1** (flèches rouges). Echelle, 500 μm . **B) Observation du phénotype à l'extrémité racinaire, en présence de galvestine-1** L'extrémité racinaire est appelée apex, composé de la zone d'élongation racinaire qui se termine par la coiffe. En galvestine-1, l'apex racinaire est plus fin et la coiffe est plus large en forme de « massue », comparé au contrôle. Barre d'échelle : 100 μm

c) Effet de la galvestine-1 au niveau du profil lipidique

Le profil lipidique, obtenu après extraction totale des lipides de plantules d'*Arabidopsis* cultivées en présence de galvestine-1, montre une forte diminution du MGDG, tandis que la proportion relative de phospholipides est augmentée (Botte et al., 2011) (Figure B.10). L'inhibition *in vivo* de la synthèse de MGDG a été mesurée par marquage métabolique avec du [14 C]-acétate. Le niveau de DGDG restant stable en présence de galvestine-1, le traitement induit par conséquent une altération de la balance MGDG/DGDG. Le profil lipidique des plantules qui résulte du traitement à la galvestine-1 montre un changement de la balance galactolipides/phospholipides. L'analyse du MGDG indique que la proportion en AG saturée est augmentée, suggérant que la synthèse du MGDG est basée sur des précurseurs plutôt d'origine eucaryote que procaryote.

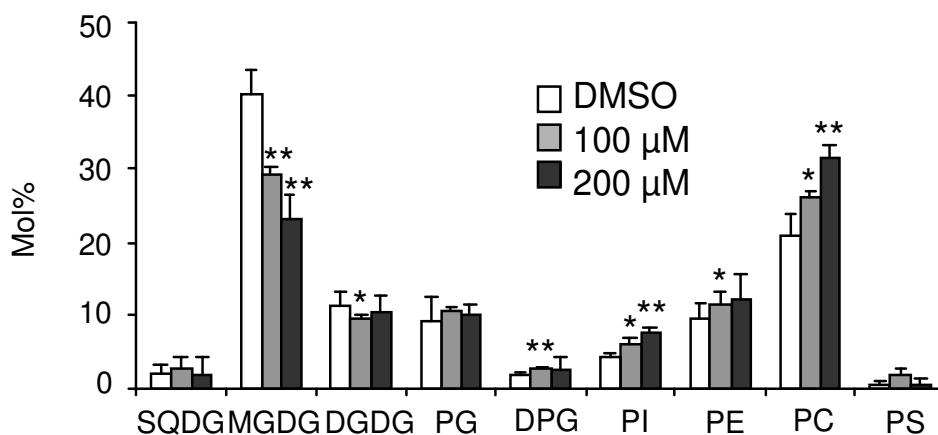


Figure B 10 : Profil lipidique de rosettes d'*Arabidopsis* traitées en galvestine-1. Les lipides ont été extraits et analysés par chromatographie sur couche mince en 2 dimensions. Chaque classe de glycérolipide a été quantifiée par chromatographie en phase gazeuse des méthyl-esters d'acides gras. L'histogramme représente la moyenne de 3 expériences indépendantes avec l'erreur standard. *P < 0.05 et **P < 0.005 du test de Student (Botte et al., 2011).

d) Effet de la galvestine-1 dans le développement floral et l'élongation du tube pollinique

Le patron d'expression de *MGD1*, *MGD2* et *MGD3* a attiré l'attention sur les fleurs. En effet celles-ci expriment principalement *MGD2* et *MGD3* (Awai et al., 2001). Dans les fleurs de Pétunia, le DGDG est le galactolipides majeur comparé à d'autres organes (Nakamura et al., 2003). Durant le développement floral, le taux de MGDG augmente avec un profil d'acyls riche en C16:0, C18:0, C18:1 et C18:2, caractéristiques de la voie eucaryote. Le pistil est l'organe présentant la plus haute teneur en MGDG. En utilisant des fusions

promoteur::GUS, de forts niveaux d'expression des promoteurs de MGD2 et MGD3 ont pu être détectés dans les tubes polliniques en croissance, coïncidant avec une augmentation de la synthèse des galactolipides. Cependant, aucune différence de croissance n'a pu être observée au niveau des tubes polliniques chez les mutants *mgd2* x *mgd3* (Kobayashi et al., 2009), vraisemblablement du fait de la présence de MGD1 (Shimajima and Ohta, 2011). La croissance *in vitro* du tube pollinique d'*Arabidopsis* a pu être inhibée partiellement et de manière dose dépendante, par la galvestine-1, indiquant qu'une partie de la croissance du tube pollinique était liée à la synthèse des galactolipides (Botte et al., 2011). L'accumulation de DGDG dans la membrane plasmique du tube pollinique a pu être détectée par immuno-marquage à l'aide d'un anticorps anti-DGDG, suggérant que les plastes contribuent à la demande intense de lipides membranaires requise au niveau de la membrane plasmique, pour permettre l'élongation du tube pollinique.

Un rôle des galactolipides dans le développement floral a aussi été suggéré. Dans des travaux récents, le mutant *mgd1-2* a été complété avec une MGDG synthase bactérienne, clonée à partir de *Chlorobaculum tepidum*, exprimé sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (Masuda et al., 2011). Il en résulte un niveau normal de MGDG dans le mutant, mais un contenu réduit en chlorophylle d'environ 80% comparé à une plante standard et une altération du développement du mutant. Les organes floraux de ce mutant ne sont pas fertiles et ne peuvent pas générer de graines, même par pollinisation artificielle. La taille des fleurs est fortement réduite avec un développement anormal des étamines au niveau des anthères et des pistils. Cette étude indique que des connexions existeraient entre le patron d'expression du gène *MGD1* et le développement des plantes, incluant le développement floral. Cette relation n'est pas élucidée à ce jour.

3. Comparaison des mutants des MGDG synthases et des plantes traitées en présence de galvestine-1

Dans des plantes sauvages d'*Arabidopsis*, cultivées en conditions standard, le profil des acyls du MGDG est principalement constitué de C16:3 et de C18:3, indiquant que le MGDG néosynthétisé est rapidement désaturé par les FAD5, FAD6, FAD7/8, produisant alors du MGDG polyinsaturé. Par contraste, le DGDG contient principalement du C16:0 et du C18:3, sachant que le 16:0 est en position *sn*-1. Cette différence des profils d'acides gras indique qu'une sorte de bifurcation s'opère pour l'utilisation de MGDG entre FAD5 qui

aiguille vers une accumulation de MGDG et DGD1/DGD2 qui aiguille vers une conversion en DGDG (Boudiere et al., 2012).

Dans le mutant *mgd1-1*, le niveau de MGDG diminue (il ne s'agit pas d'un KO mais d'une chute de l'expression génique de *MGD1*) tandis que le niveau de DGDG reste stable. Ce résultat indique que bien que la quantité de MGDG ait diminué, elle n'est pas limitante pour la production de DGDG. Un « channelling » de MGDG néosynthétisé (riche en C16:0) pour générer du DGDG *via* MGD2 et MGD3 pourrait ainsi se produire (Boudiere et al., 2012). Dans le mutant KO *mgd1-2* (Kobayashi et al., 2007), les plantules croissent uniquement sur un milieu riche en sucre et présentent un phénotype albinos. Une petite quantité de MGDG et de DGDG est détectée, montrant ainsi que dans ce fond génétique, MGD2 et MGD3 ne suffisent pas à produire tout le DGDG nécessaire au développement du chloroplaste. Le profil d'acyls du MGDG est enrichi en C16:0, C18:0, C18:1 et C18:2, indiquant que ces lipides ont été produits à partir de précurseurs provenant de la voie eucaryote. De manière intéressante, le profil d'acyls du DGDG est *identique* à celui du MGDG, confirmant encore l'hypothèse d'un « channelling » de MGD2, MGD3 et DGD1 ou DGD2. Le manque de MGDG C16:3 soutient l'existence d'un « channelling » par MGD1 et FAD5 dans un fond génétique d'une plante standard (Boudiere et al., 2012).

Comme mentionné plus haut, les mutants *mgd2*, *mgd3* et *mgd2 x mgd3* ne présentent pas de phénotype dans des conditions de cultures standards (Kobayashi et al., 2009). Ceci indique que MGD1 pourrait synthétiser le MGDG requis pour l'expansion des membranes à la fois dans l'IEM et dans l'OEM. Il n'y aurait donc pas de corrélation entre la localisation de MGD1 et l'expansion de l'IEM ou la localisation de MGD2/MGD3 et l'expansion de l'OEM. Dans le mutant *mgd3-1*, une modification du profil d'acyls du MGDG peut être observée en carence de phosphate, soutenant le rôle de MGD3 dans cette condition. Une partie de la fonction de *MGD2* et *MGD3* peut être déduite de leur expression dans des tissus non photosynthétiques, telles que les racines, mais aussi dans le tube pollinique (Kobayashi et al., 2004), comme détaillé plus haut. Néanmoins, la caractérisation fonctionnelle est limitée, la construction du triple mutant *mgd1 x mgd2 x mgd3* n'étant pas réalisable,

La galvestine-1 a de ce fait représenté un outil complémentaire. En effet, cet outil permet l'analyse de conditions qui ne pourraient pas être testée par une approche génétique. Toute la famille multigénique des MGDG synthases est ciblée dans un même fond génétique. Ainsi il a pu être démontré que la croissance du tube pollinique est altérée en présence de

galvestine-1 (Botte et al., 2011). Les phénotypes observés en présence de galvestine-1 sont cohérent avec ceux des mutants *mgd1-1* et *mgd1-2*, soulignant ainsi l'importance du MGDG pour le fonctionnement optimal et le développement de la plante.

4. Gènes candidats identifiés à partir de données transcriptomiques dans différentes conditions altérant l'homéostasie lipidique

Une méthode couramment utilisée pour étudier les composants des voies de signalisation d'un système, est l'analyse transcriptomique à partir d'un profil d'ARNm en fonction de changements environnementaux. Dans le but d'étudier l'homéostasie lipidique, une perturbation du système efficace est la carence en phosphate, qui provoque un remodelage des membranes, une modification de la synthèse des différents glycérolipides et la mise en jeu d'un trafic lipidique intense. Dans plusieurs études complémentaires, des plantes d'*Arabidopsis* ont donc été cultivées sur un milieu carencé en Pi et une analyse transcriptomique (sur puce ATH1 affymetrix) a été réalisée (Misson et al., 2005; Morcuende et al., 2007). Ces travaux ont permis d'identifier plusieurs gènes dont l'expression varie, comme par exemple *MGD2*, *MGD3*, *SQD2* et *DGD2*, qui sont sur-exprimés lors de la carence en Pi. Cette sur-expression des gènes de synthèses est vraisemblablement responsable de l'augmentation à long terme de la synthèse des galactolipides, ainsi que du sulfolipide induites par une carence en Pi. Les gènes codant pour les phospholipases *PLD ζ 1*, *PLD ζ 2*, *NPC4* et *NPC5* sont également sur-exprimés et l'étude des phénotypes des mutants correspondants était cohérente avec un approvisionnement en précurseurs pour le MGDG.

L'analyse transcriptomique de plantes *Arabidopsis* traitées en présence de galvestine-1 à court (3 jours) et long terme (13 jours) a permis aussi de pointer plusieurs gènes dont l'expression variait, dont certains codent pour des protéines potentiellement impliquées dans l'homéostasie lipidique. Les effets sur la variation d'expression de *MGD1*, *MGD2*, *DGD1* et *DGD2* sont faibles. Cependant, il est à noter que *MGD1* et *MGD2* ont leur expression légèrement diminuée après un traitement à long terme de la galvestine-1. L'expression de 525 gènes est diminuée de manière dose- et temps-dépendantes. Ces gènes incluent ceux qui codent pour des protéines des thylacoïdes, ce qui pourrait expliquer le phénotype fort au niveau du chloroplaste en présence de galvestine-1, notamment la diminution des membranes thylacoïdiennes et la réduction de la taille de l'organite. Lorsque les données des analyses transcriptomiques sont croisées, 22 gènes sont identifiés comme sous-exprimés en présence

de galvestine-1 et sur-exprimés en carence de Pi. Ces gènes incluent *SQD2*, *PHO1;H1*, et *PHO81*, deux transporteurs de phosphate et *SRG3* codant pour une glycérophosphoryldiester phosphodiesterase. Parmi les gènes dont l'expression varie en présence de galvestine-1, 182 sont sur-exprimés de manière dose dépendante et temps dépendante. Soixante-neuf d'entre eux sont sur-exprimés après d'une exposition courte à la galvestine-1; 90 sont sur-exprimés sur un plus long terme et dans des concentrations plus élevée de galvestine-1 et 23 sont fortement sur-exprimés dans toutes les conditions. De nombreuses enzymes liées à l'homéostasie lipidique sont dans cette courte liste de gènes sur-exprimés. Ceci indique que la présence de galvestine-1 semble modifier le système lipidique et induire une réorganisation.

Un rappel bibliographique spécifique sur la fouille des données de puces est détaillé dans le chapitre 2 des résultats.

V. ALA10, une flippase putative identifiée par des analyses transcriptomique après une carence en phosphate et traitement à la galvestine-1

Le croisement des données transcriptomiques obtenues à partir de plantes cultivées en carences de Pi (Misson et al., 2005; Morcuende et al., 2007) et de plantes ayant subi un traitement à la galvestine-1 (Botte et al., 2011) a permis de cibler plusieurs gènes candidats liés au métabolisme lipidique, dont l'expression varient dans ces deux conditions. Ces gènes candidats pourraient permettre d'éclairer nos connaissances sur les mécanismes de régulation des systèmes lipidiques. Parmi ces gènes, nous nous sommes intéressés à *ALA10*, fortement sur-exprimé en carence de Pi (Misson et al., 2005) et fortement sur-exprimé après traitement à la galvestine-1 (Botte et al., 2011).

La séquence en acides aminés d'ALA10 présente un alignement significatif (voir ci-dessous) avec celles des flippases de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, i.e. Drs2p, Dnf1p, Dnf2p, Dnf3p et Neo1p (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) (Paulusma and Elferink, 2010) (Figure B 11 et 12). Les premières informations sur cette famille de protéines proviennent des 5 ATPases de la levure: Drs2 (Defective in Ribosome Synthesis 2), Neo1 (Neomycine resistance 1), Dnf1, Dnf2 et Dnf3 (Drs2 et Neomycine Family 1 à 3). Ces protéines sont membranaires, Drs2p est localisée principalement au niveau du réseau post-

golgien (Natarajan et al., 2004) tandis que Dnf1p et Dnf2p sont localisées dans la membrane plasmique (Pomorski et al., 2003).

L'homologie d'ALA10 est d'environ 29% avec Drs2p, Dnf1p, Dnf2p, 23% avec Dnf3p et 16% avec Neo1p. Cet alignement de séquence (Figure B 12) a permis d'identifier 2 domaines sur la séquence protéique d'ALA10 : un domaine de la famille des P4-TPases (ou E1-E2 ATPase) et un domaine de la famille des hydrolases haloacid dehalogenase-like (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Ces informations suggèrent qu'ALA10 pourrait être une ATPase de type P4, tout comme Drs2p, Dnf1p, Dnf2p, Dnf3p et Neo1p.

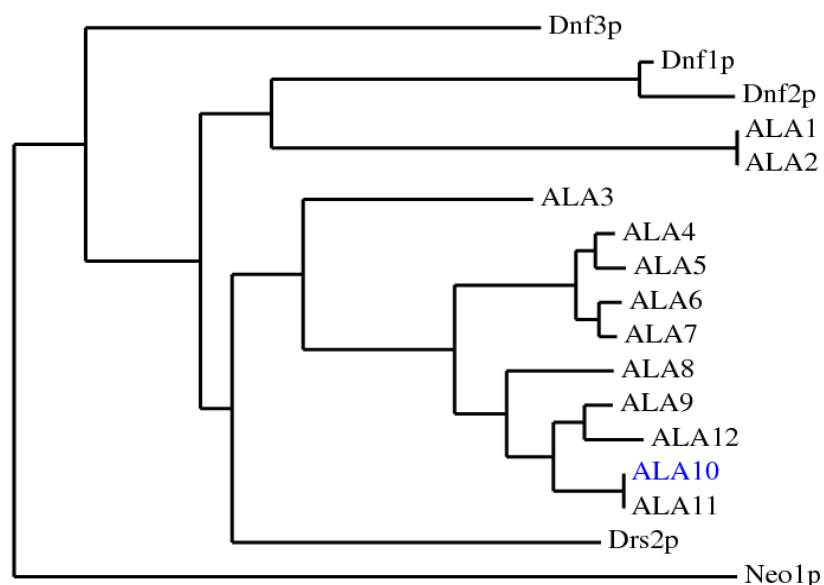


Figure B 11 : Analyse phylogénique des protéines de la famille des ATPases de type P4 chez *Arabidopsis thaliana* et *Saccharomyces cerevisiae*. Cette phylogénie moléculaire simplifiée a été reconstruite en utilisant le logiciel d'alignement de séquences ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>). Les ATPases de type P4 sont subdivisée en classes basées sur les séquences consensus des amino-acides.

1. Les ATPases de type P4

Nous avons vu précédemment que les membranes d'origine eucaryotes étaient riches en phospholipides. La composition en phospholipides de la plupart de ces membranes est asymétrique. Par exemple dans la membrane plasmique des cellules de mammifères, la PE et la PS sont principalement présentes dans le feuillet cytosolique tandis que la PC est majoritairement dans le feuillet extra cellulaire (Jouhet et al., 2007). Il a été montré que la répartition des phospholipides au sein des membranes joue un rôle important dans plusieurs

processus biologiques comme l'apoptose, la cytokinèse et les interactions de type hôte-pathogène (Devaux et al., 2008; Sebastian et al., 2012).

Chez les plantes, plusieurs cas d'asymétries au niveau des membranes ont été rapportés (Jouhet et al., 2007). La membrane plasmique présente une asymétrie avec de la PS composant majoritairement le feuillet cytosolique de la membrane. Au niveau de la membrane du tonoplaste, une légère asymétrie a été détectée avec de la PE composant majoritairement le feuillet cytosolique de la membrane. Dans les plastes limités par des deux membranes de l'enveloppe, la PC est présente uniquement dans la membrane externe, majoritairement au niveau du feuillet cytosolique. Dans les thylacoïdes, le feuillet externe a une proportion plus importante de MGDG et de PG, tandis que le feuillet interne est enrichi en DGDG et en SQDG.

Cette asymétrie est établie grâce à des protéines capables de catalyser le transport de phospholipides d'un feuillet de la membrane à un autre, par un mécanisme ATP-dépendant appelé mouvement « flip flop ». Comme nous l'avons vu plus haut, les protéines capables de catalyser ce transfert comprennent les transporteurs ABC ainsi que les ATPases de type P4 (Paulusma and Elferink, 2010).

Chez les organismes eucaryotes, les ATPases de type P4 ont un rôle biologique important dans le trafic vésiculaire. La déficience de certaines ATPases de type P4 conduit à des pathologies sévères telles que des neurodégénérescences, un retard mental, de l'obésité ou même des cancers chez l'Humain et la Souris (van der Mark et al., 2013). Des études chez la souris ont ainsi montré qu'une déficience en ATPases de type P4 conduit à une externalisation de la PS au niveau de la membrane des neurones de l'hippocampe et provoque des troubles du comportement ainsi qu'un processus d'apprentissage altéré (Levano et al., 2012; van der Mark et al., 2013). Ces études démontrent l'importance des ATPases de type P4 dans la maintenance de l'asymétrie lipidique des membranes chez plusieurs organismes.

Les ATPases de type P sont caractérisées par la formation d'un intermédiaire phosphorylé et possèdent une grande variété de spécificité pour leurs substrats, allant des ions de métaux lourds (P1, P2 et P3) pour la plupart des ATPases de type P connues aux phospholipides (P4). Les ATPases de type P sont composées de 4 parties : un domaine activateur cytosolique, un domaine de liaison au nucléotide, un domaine de phosphorylation et une partie contenant 10 segments transmembranaires (TM). Les structures cristallines obtenues au rayon X avec liaison aux substrats ont été résolues pour les ATPases P1, P2 et P3,

qui utilisent un domaine hautement conservé pour l'interaction avec les ions dans le centre des TM (Toyoshima et al., 2000; Morth et al., 2007; Pedersen et al., 2007; Gourdon et al., 2011). Le canal ionique est formé par des résidus chargés et polaires appartenant aux segments TM4, 5, 6 et 8 pour les ATPases Ca^{2+} (Toyoshima, 2008) et les segments TM 4, 5, 6, 8 et 9 pour les ATPases Na^+/K^+ (Shinoda et al., 2009). L'accessibilité au canal ionique dépend de l'état de conformation E1-E2 qui alterne entre le côté cytosolique (E1) (Figure B 13, B), une obstruction temporaire du canal (E1P/E2P) (Figure B 13, C) et le côté exofacial de la membrane (E2) (Toyoshima et al., 2004). Ce changement d'état est associé à la liaison à l'ATP, au transfert du phosphate de l'ATP à un résidu aspartate conservé et à l'hydrolyse subséquente de la liaison aspartyl-phosphate (Morth et al., 2011).

Concernant la translocation de phospholipides par les ATPases de type P4, deux modèles ont été proposés :

- le premier propose l'utilisation du canal ionique pour transporter le phospholipide;
- le second propose l'utilisation d'une autre voie que le canal ionique, formée à l'interface protéine/lipide

Le premier modèle est basé sur l'observation que la mutation d'un résidu lysine conservé dans une ATPase de type P4 chez les animaux, qui est prédite pour être situé dans le canal ionique au niveau du TM5, réduit l'affinité de la pompe pour son substrat (Coleman et al., 2012).

Le second modèle soutenant un transport par une voie autre que le canal ionique repose sur une étude où les résidus impliqués dans l'interaction avec les phospholipides ont été cartographiés au niveau de TM3-TM4 dans deux ATPases de la levure : Dnf1, une flippase de la PC et de la PE, et Drs2, une flippase de la PS (Baldrige and Graham, 2012). Un résidu en 618^{ème} position de la séquence protéique a ainsi été identifié dans le TM4 pour contrôler le transport de la PS ; chez Dnf1, une tyrosine (Y) n'est pas favorable à la sélection de la PS, tandis que chez Drs2, une phénylalanine (F) est favorable à la sélection de la PS (Figure B 12 et B 13, A). Cette tyrosine (Y618) est un résidu clé dans la détermination de la spécificité pour un phospholipide car la substitution par une F à la même position aboutit à un transport de PS. En revanche, la substitution de la F par une Y à la même position chez Drs2 abolit le transport de la PS. Un autre résidu a été identifié dans la boucle exofaciale entre le TM3 et le TM4, une phénylalanine (F), favorisant la sélection de la PC pour Dnf1. La

structure cristallographique révélée par rayon X de Dnf1 indique que la tyrosine 618 (Y618) est localisée en dehors du canal ionique et permettrait alors un transport de phospholipide par une autre voie (Toyoshima et al., 2000; Morth et al., 2007; Pedersen et al., 2007; Gourdon et al., 2011; Baldrige and Graham, 2012, 2013). D'autres résidus des TM1-4 de Dnf1 et Drs2 ont aussi été identifiés conférant une spécificité pour le phospholipide transporté. Ces résidus sont regroupés en 2 "portes" de sélection du phospholipide : une "porte d'entrée" sur la membrane exofaciale où le phospholipide est sélectionné et une "porte de sortie" située au niveau de la face cytosolique de la membrane où le substrat est relâché (Figure B 13, A). La position des résidus impliqués dans la reconnaissance du phospholipide transféré dans les TM1-2 et TM3-4 est incompatible avec un transport passant par le canal ionique. Ces résultats soutiennent donc le modèle non canonique impliquant un mécanisme à deux portes pour la transport d'un phospholipide par des ATPases de type P4 (Baldrige and Graham, 2013) (Figure B 13, D et E).

Basé sur ces informations, l'alignement d'ALA10 avec les flippases de la levure, Dnf1p et Drs2, montre que plusieurs résidus communs à Dnf1 sont retrouvés dans la séquence protéique d'ALA10, tels que la Y618 et la F au niveau de la boucle exofaciale entre TM3 et TM4. Ces données suggèrent qu'ALA10 aurait une affinité préférentielle pour la PC plutôt que pour la PS. Actuellement, et en complément des travaux présentés dans ce mémoire, des études sont menées pour évaluer la possibilité qu'ALA10 complémente le phénotype de *Saccharomyces cerevisiae* délété de la flippase Drs2p (collaboration Patrice Catty, Chimie et Biologie des Métaux, CBM, CEA Grenoble).

2. Les sous-unités des ATPases de type P4

Les ATPases de type P4 comportent une sous-unité appartenant à la famille des Cdc50 (Cell Division Cycle 50). Les Cdc50 sont des protéines transmembranaires ayant un rôle dans la croissance polarisée des levures et localisées au niveau des endosomes et du réseau trans-golgien (Saito et al., 2004). Cette sous-unité des ATPases de type P4 contribue au transport du phospholipide (Saito et al., 2004; Lenoir et al., 2009) mais sa contribution dans le mécanisme de transport ne semble pas directe. Les Cdc50 sont en fait des sous-unités non catalytiques (Noji et al., 2006; Takahashi et al., 2011). Elles forment des complexes avec les ATPases de type P4 chez la levure : Drs2p interagit avec Cdc50p, Dnf1p et Dnf2p interagissent avec Lem3p et Dnf3p avec Crf1p. Aucun partenaire n'a été identifié pour Neo1p à ce jour. La

présence de la Cdc50 en complexe avec l'ATPase de type P4 est en fait nécessaire pour le transport de l'ATPase du RE au réseau trans-golgien ou à la membrane plasmique (Saito et al., 2004; Paulusma et al., 2008).

Chez *Arabidopsis*, des homologues des Cdc50 existent. Elles sont nommées ALIS 1 à 5 (ALA Interacting Subunit ; (Poulsen et al., 2008; Poulsen et al., 2008)). Les protéines ALIS possèdent 2 segments transmembranaires et une large boucle extra cellulaire (Poulsen et al., 2008).

Partie bibliographique

	-----TM3-----
Dnf1p	KKSRI SREL N FSVVIN FVLLFILCFVSGIANGVY YDK KGR ---S-----RFSYEFG-
ALA1	KRSRL ETRMNL EI I LLSLFLIVLCTIAAATAAVWL RTHRDDL D-TILFYRRKDYSERPGG
ALA2	KRSRL ETRMNL EI I LLSLFLIVLCTIAAATAAVWL RTHRDDL D-TILFYRRKDYSERPGG
ALA3	KRSTLEKKLDKLIITIFCVLV TMCLIGAIGCSIVTDREDKYLG-----LH--NSD--
ALA4	KRSRIEKTMDYIIYTLLVLLILISCISSSGFAWETKFHM----PKWWYL RPPEEPENL--
ALA5	KRSRIERTMDYIIYTLLVLLILISCISSSGFAWETE FHM----PKMWYL RPGEPIDE
ALA6	KRSRIEKRM DYIIYTLFALLLT VSFISSLGFAVMTKLLM-----AEWWYL RPDKPESL--
ALA7	KRSRIEKRM DYIIYTLFALLVLVSFISSLGF AVMTKMH M-----GDWWYL RPDKPERL--
ALA8	KRSKI EKMDQIIYILF SILIVIAFTGSVF FGIA TRDMSDNGLRRWYL RPDHTTVE
ALA9	KRSMIEKMDKI IYLMFFMVITMAFIGSVIFGVTT RDD-LKDGMKRWYL RPDSSSIF
ALA10	KRSRIERTMDKI IYLMFGLVFLMSFVGSI IFGVETREDDKVKNGRTERWYLPDDADIF--
ALA11	KRSRIERTMDKI IYLMFGLVFLMSFVGSI IFGVETREDDKVKNGRTERWYLPDDADIF--
ALA12	KRSMIERKMDKI IYLMFLMVFSLAFFGSVLFGIWTRDD-FQNGVMERWYLPDDSSSIF--
Drs2p	KRTAVEKIIINRQIIALFTVLIVLILISSIGNVIMSTADAKHL---S-----YLY--
	*:: : : : : :
	-----TM4-----
Dnf1p	--TIAGSAATNGFVSFWVA VILYQSLVPISLY ISVEIK
ALA1	KNYKYYGWGWEIFFTF FM AVIVYQIMIPISLYISMELVR
ALA2	KNYKYYGWGWEIFFTF FM AVIVYQIMIPISLYISMELVR
ALA3	--WEYRNGLMIGFFTFTLVT LFSSI IPISLYV SIEMIK
ALA4	--TNPSNPVYAGFVHLITALLLYGYLIPISLYV SI EVVK
ALA5	--TNPINPIYAGVVHLITALLLYGYLIPISLYV SI EVVK
ALA6	--TNPTNPLYAWVVHLITALLLYGYLIPISLYV SI EVVK
ALA7	--TNPRNPFHAWVVHLITAVLLYGYLIPISLYV SIELVK
ALA8	--YDPRAVAAAFHF LTALMLYGYLIPISLYV SI EVVK
ALA9	--FDPKRAPVA AIYHFLTAVMLYSYFIPISLYV SI EIVK
ALA10	--FDPERAPMAAIYHFFTATMLYSYFIPISLYV SI EIVK
ALA11	--FDPERAPMAAIYHFFTATMLYSYFIPISLYV SI EIVK
ALA12	--FDPKRAPMAAIYHFLTALMLNSYFIPISLYV SI EIVK
Drs2p	--LEG TNKAGLFFKDFLTFWILF SNLVPISL FVTVELIK
	. : : :*****::*::

Résidu favorable à la reconnaissance de la PC

Résidu favorable à la reconnaissance de la PS

Résidu défavorable à la reconnaissance de la PS

Figure B 12 : Alignement des séquences protéiques de ALA1 à ALA12 d'*Arabidopsis thaliana* avec les flippases Dnf1p et Drs2p de *Saccharomyces cerevisiae*. Les séquences protéiques des différentes flippases présentées sont représentées au niveau des domaines transmembranaires TM3 et TM4. Certains résidus confèrent une spécificité pour un substrat comme la PC (en vert) ou la PS (en bleu). D'autres résidus sont défavorables à l'interaction avec un substrat comme pour la PS (en rouge) par exemple. Ainsi certains résidus de Dnf1p indiquent une affinité spécifique pour la PC tandis que Drs2 a une affinité spécifique pour la PS. La séquence protéique d'ALA10 contient des résidus identiques à Dnf1 qui lui confèreraient une affinité pour la PC et non pour la PS.

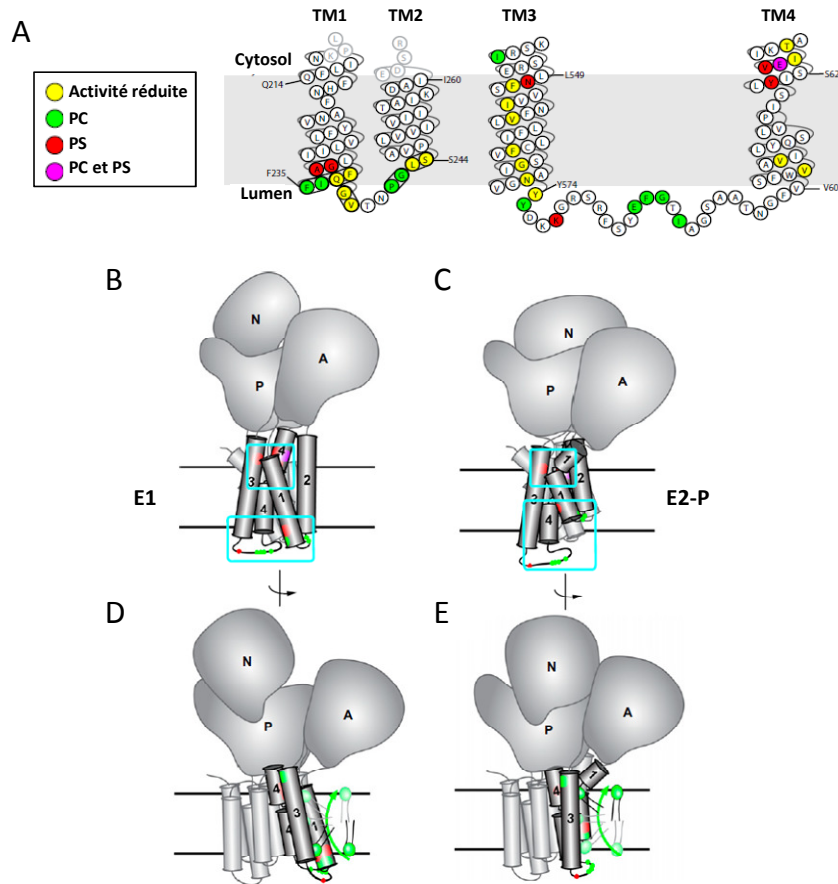


Figure B 13 : Proposition du mécanisme de transport de phospholipides par les ATPases de type P4. A) Diagramme topologique de TM1-2 et TM3-4 de Dnf1. Ce diagramme indique les positions des résidus où les mutations conduisent à une amélioration de la reconnaissance de la PS (en rouge), une diminution de la reconnaissance de la PC (en vert), ou une réduction générale de l'activité de Dnf1 (en jaune). Ces résidus sont regroupés autour d'une porte d'entrée pour les phospholipides sur la membrane (côté lumen) et une porte de sortie (côté cytosolique). **B) Dnf1 modélisé dans l'état de conformation E1 du sarco / réticulum endoplasmique Ca²⁺-ATPase-1 (SERCA1).** Ce modèle indique la position relative des résidus impliqués dans la spécificité au substrat. Les résidus sont regroupés autour d'une porte d'entrée et d'une porte de sortie (encadré en bleu) où les phospholipides sont sélectionnés de part et d'autre de la membrane. A, domaine activateur ; N, domaine de liaison au nucléotide ; P, domaine de phosphorylation. **C) Dnf1 modélisé dans l'état de conformation E2-P de SERCA1.** Ce modèle présente le changement de conformation de TM1-4 durant le cycle de pompage dû au transfert de phosphate de l'ATP au domaine P. **D), E) Mécanisme proposé pour le transport de phospholipides par une ATPase de type P4.** Le phospholipide est tout d'abord sélectionné au niveau de la porte d'entrée, probablement lorsque l'ATPase est en conformation E1. Lorsque l'ATPase passe de l'état de conformation E1 à E2-P, les TM1-2 sont déplacés dans la membrane ce qui fournirait une force physique nécessaire pour transférer la tête du phospholipide au niveau de la porte de sortie. Le substrat serait alors relâché dans le feuillet cytosolique lors de la transition E2→ E1 (Baldrige and Graham, 2013).

3. La famille multigénique des ALA

Chez *Arabidopsis thaliana*, la famille des ATPase de type P4 comporte 12 protéines nommées ALA1 à ALA12 (Aminophospholipid ATPase) (Ibrahim et al., 2011), identifiées et classifiées initialement par des comparaisons bioinformatiques (Gomes et al., 2000; Axelsen

and Palmgren, 2001). La famille des ALA est reliée phylogéniquement aux ATPases de la levure (Figure B 11). Les ALA sont de larges protéines d'environ 130 kDa avec 10 segments transmembranaires et les motifs caractéristiques des ATPases de type P4 (Axelsen and Palmgren, 1998, 2001). Jusqu'à présent quelques ALA ont été étudiées comme ALA1, ALA2 et ALA3.

La protéine ALA1 est homologue à Drs2p. Il a été montré que le mutant Δ drs2 de la levure, complété par ALA1, présentait une tolérance au froid restaurée. Cette complémentation fonctionnelle a donc suggéré l'implication d'ALA1 dans la tolérance au froid chez *Arabidopsis* (Gomes et al., 2000). Une autre étude a montré qu'ALA1 formait un complexe avec une sous-unité ALIS, ce qui lui permettait d'être adressé à la membrane plasmique (Lopez-Marques et al., 2012).

La tolérance au froid est également restaurée lorsque le mutant Δ drs2 Δ dnf1 Δ dnf2 de levure est complété avec ALA2, coexprimant les protéines ALIS1, ALIS3 et ALIS5 (Lopez-Marques et al., 2010). ALA2 permet l'internalisation de la PS dans la membrane spécifiquement en présence des protéines ALIS. Cependant, la spécificité du phospholipide sélectionné n'est pas dépendante du type d'ALIS. En absence d'ALIS, ALA2 reste localisée au niveau du RE tandis qu'en présence d'ALIS, ALA2 est détectée dans le compartiment pré vacuolaire (Lopez-Marques et al., 2010).

La flippase ALA3 est l'homologue la plus proche de Drs2p (Figure B.11). Cette ATPase est requise pour la croissance de différents tissus comme les racines, les feuilles (Poulsen et al., 2008), les tubes polliniques et les trichomes (Zhang and Oppenheimer, 2009). ALA3 est importante également pour la fertilité (McDowell et al., 2013). La complémentation fonctionnelle du mutant Δ drs2 Δ dnf1 Δ dnf2 chez la levure d'ALA3 est dépendante de la présence des protéines ALIS (ALIS1, ALIS3 et ALIS5) (Poulsen et al., 2008). Le complexe ALA3/ALIS est exporté du RE au réseau trans-golgien. ALA3 transporte aussi bien de la PE, de la PS et de la PC (Poulsen et al., 2008).

4. Quelques caractéristiques d'ALA10

La base de données qui compile les caractéristiques la structure des protéines membranaires et les localisations subcellulaires, Aramemnon (<http://aramemnon.uni->

koeln.de/), indique qu'ALA10 a été détectée dans une analyse protéomique de la membrane plasmique et qu'elle pourrait comporter une séquence d'adressage à la mitochondrie.

L'étude comparée de profils transcriptomiques de gènes d'*Arabidopsis thaliana* dans des conditions physiologiques et environnementales variables montrent qu'ALA10 est coexprimée avec *PLDγ1* (<http://atted.jp/>) (Figure B 14). En effet, il est à noter que comme pour ALA10, le gène *PLDγ1* est retrouvé sur-exprimé dans l'analyse transcriptomique de plantes d'*Arabidopsis* ayant été traitées à la galvestine-1 (Botte et al., 2011). La phospholipase codée par ce gène est impliquée dans la modulation des lipides membranaires en condition de stress à l'aluminium (Zhao et al., 2011). Or, les PLDs sont connues pour produire de l'AP qui sert à la synthèse des galactolipides (Dubots et al., 2012). Pour l'ensemble de ces raisons, nous avons émis l'hypothèse qu'un lien pourrait exister entre ALA10 et la synthèse des galactolipides, et nous avons sélectionné ce gène candidat pour nos études.

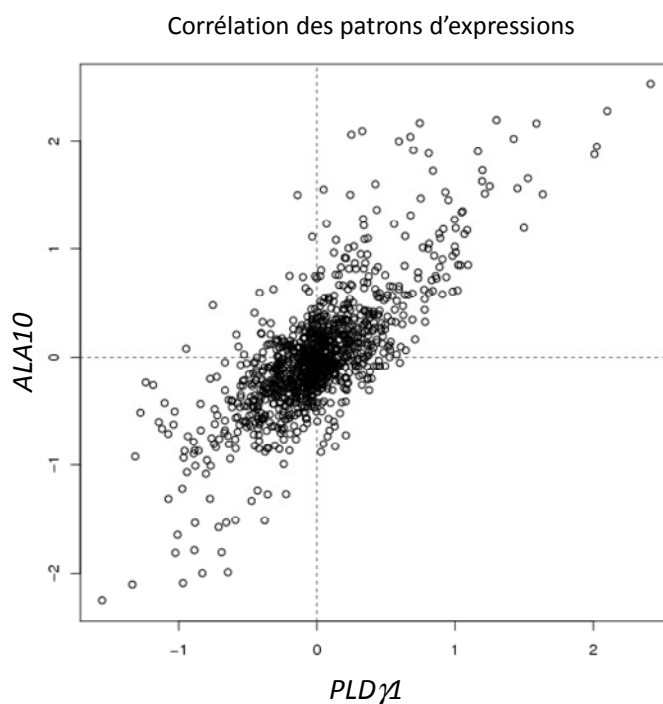


Figure B 14 : Diagramme de corrélation des expressions des gènes ALA10 et *PLDγ1*. Ce diagramme indique que les gènes ALA10 et *PLDγ1* sont coexprimés (Diagramme généré à l'aide de la plateforme de comparaison de profils transcriptomiques ATTEDII, <http://atted.jp/>).

VI. Objectifs de la thèse

Un premier axe de ma thèse a été d'exploiter l'activité de la galvestine-1 comme un inhibiteur de la synthèse des galactoglycérolipides dans le but de faire progresser nos connaissances des processus impliqués dans l'homéostasie des lipides membranaires chez *Arabidopsis thaliana*. J'ai donc réalisé un criblage d'une collection de mutants EMS afin d'identifier et de caractériser des plantes résistant à la galvestine-1. Par une approche de génétique directe classique, le but est d'identifier les mutations conférant la résistance et de disséquer le rôle possible des gènes mutés dans le contexte de la synthèse, de la conversion, du trafic de lipides membranaires ou de tout autre processus lié au métabolisme, à la régulation ou à la physiologie d'*Arabidopsis*.

Un autre axe de ma thèse a été de mener une approche de gène candidats à partir des données transcriptomiques issues de plantes ayant été traitées à la galvestine-1 avant mon arrivée au laboratoire (Botte et al., 2011). Nous nous sommes intéressé à ALA10, une flippase putative qui est sur-exprimée en présence de galvestine-1 mais aussi en carence de phosphate (Misson et al., 2005). Le but de cette étude a été d'analyser la relation entre l'expression d'*ALA10* et les gènes impliqués dans la synthèse des galactolipides chez *Arabidopsis*.

Matériel et Méthodes

Matériel et méthodes

I. Matériel végétal et méthodes de cultures

1. Culture d'*Arabidopsis thaliana*

a) Ecotypes utilisés

Les études ont été réalisées chez *Arabidopsis thaliana*, écotype *Columbia* (Col). Pour le criblage de mutants aléatoires (chapitre I), le fond génétique utilisé est l'écotype *Columbia* contenant la mutation *erecta 105* (Col^{er105}), conférant aux plantes un phénotype de petite taille, facilitant culture et croisements. Pour la cartographie des mutations sélectionnées suite au criblage, les croisements ont été réalisés entre les mutants sélectionnés (appelés gali) et des plants sauvages d'écotype Landsberg (Ler).

b) Culture en terre

Stérilisation des graines et semis en terre

Des graines d'*Arabidopsis thaliana* sont congelées 2 heures à -80°C afin d'éviter l'éclosion éventuelle d'œufs d'insectes pathogènes (par exemple des trips). Les graines sont ensuite incubées pendant 2 min dans de l'éthanol (EtOH) 70% (v/v), puis pendant 15 min dans une solution d'hypochlorite de sodium 4% (v/v) et Tween-20 4% (p/v). Trois rinçages avec de l'eau stérile sont réalisés avant d'ajouter une solution d'agarose 0,2% dont la viscosité facilite le semis. Les graines sont semées sur un mélange de terreau / vermiculite (ratio 3:1), puis transférées en chambre de culture (humidité 80% ; 20°C ; lumière blanche de densité de flux de photons de 70 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) dans un cycle de type jour-long (16 h lumière/8 h obscurité) favorisant la croissance végétative.

c) Culture sur milieu solide

Semis sur milieu Murashige et Skoog (MS) complété en saccharose

Les graines sont stérilisées suivant le protocole décrit plus haut (voir I.1.b) et semées dans des boîtes stériles (boîtes de pétri ou plaques multipuits de 48 puits) contenant du milieu Murashige et Skoog (MS, Sigma) ($4,4 \text{ g.L}^{-1}$) selon les instructions du fournisseur), complété avec du saccharose, 0,5% (p/v), de l'agarose, 0,8% (p/v), et avec un pH ajusté à 5,7 avant stérilisation par autoclave.

Pour la culture de plantes issues de transformations avec un vecteur contenant un gène de résistance à la Kanamycine. De la Kanamycine (50 mg.L^{-1}) est ajoutée au milieu autoclavé, à l'aide d'une solution d'antibiotique concentrée (1 g.L^{-1}), stérilisée par filtration (filtres stériles, $0,22 \mu\text{m}$ de diamètre de vide de maille).

Semis sur un milieu MS complété en saccharose et en galvestine-1

Pour un semis sur un milieu complété avec de la galvestine-1, l'herbicide est ajouté à la concentration indiquée dans les différentes études, à l'aide d'une solution concentrée (25 mM de galvestine-1, Tween-20 20% (v/v), dans de l'eau), homogénéisée par sonication avant son utilisation. La concentration finale de Tween-20 est ajustée à 0,2%. Dans le cas de semis réalisés pour évaluer la croissance des racines, une solution stock de galvestine-1 à 30 mM dans du DMSO est utilisée. La concentration finale de DMSO est ajustée à 1%.

Stratification et culture en cycle de jours longs

Pour l'ensemble de ces conditions, après semis, les boîtes sont placées à l'obscurité et à 4°C pendant 2 jours (stratification) avant d'être transférées en chambre de culture (humidité 60%, 22°C ; lumière blanche de densité de flux de photons de $70 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) dans un cycle de type jour-long (16 h lumière/8 h obscurité) favorisant la croissance végétative.

2. Plantes transformées génétiquement

a) Mutants générés par insertion de T-DNA

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie pathogène qui possède un plasmide Ti, de 214 kb, permettant à la bactérie de transférer un fragment appelé ADN-T, dans le génome d'*Arabidopsis*. Ce fragment d'ADN s'intègre de manière aléatoire dans le génome nucléaire de la cellule hôte. Les gènes naturellement présents dans l'ADN-T peuvent être remplacés par des gènes d'intérêt, suivant les techniques classiques de biologie moléculaire. Cette bactérie est donc très utilisée pour construire des plantes transgéniques. La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisée est la souche C58, résistante à la rifampicilline et à la carbenicilline et ne possédant pas de plasmide Ti.

Des collections de mutants d'insertions cartographiés génomiquement ont été mises à la disposition de la communauté scientifique. Le mutant *ala10* utilisé pour cette étude présente une insertion d'étiquette dans le gène *ALA10* (gène At3G25610 ; mutant SALK_024877), et provient de la collection du SALK institute. Les plantes homozygotes du mutant *ala10* ont été sélectionnées par PCR de génotypage (voir II.1.c). Celles-ci ont ensuite été croisées avec des plantes sauvages d'écotype *Columbia* pour éliminer les insertions contaminantes potentielles. Ensuite, dans la génération suivante, une sélection de plantes homozygotes du mutant *ala10* est à nouveau effectuée. Les mutants d'insertion d'ADN-T des collections de mutants d'*Arabidopsis* du SALK institute, contiennent des ADN-T qui portent un gène de résistance à la kanamycine. L'étude de la ségrégation Kan^R des plants permet de confirmer que la lignée sélectionnée est homozygote, c'est-à-dire une génération de 100% de plantes résistantes. Dans le cas d'une lignée hétérozygote, 75% de la génération de plantes est résistante tandis que 25% est sensible (loi de la génétique de Mendel). Il peut alors y avoir d'éventuelles insertions additionnelles d'étiquette.

b) Lignées exprimant la protéine ALA10 fusionnée à la GFP

Dans le but d'observer la localisation subcellulaire d'une protéine, des lignées d'*Arabidopsis* peuvent être générés pour sur-exprimer la séquence codante pour cette protéine fusionnée à la séquence d'une protéine fluorescente, la GFP (green fluorescent protein).

Le principe de la transformation est basé comme précédemment sur l'insertion de l'ADN-T d' *Agrobacterium tumefaciens*. Le vecteur binaire *E. coli*/*Agrobacterium* pEL103 (créé par Eric Lam, Université du New Jersey, USA) est dérivé du plasmide Ti d' *Agrobacterium tumefaciens*. Ce vecteur confère une résistance à la kanamycine à son hôte. Il comporte entre les bords droit et gauche de l'ADN-T une construction destinée à l'expression de protéines chez les plantes, comprenant le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV 35S), un activateur traductionnel Ω et le terminateur du gène de la nopaline synthase. Dans ce vecteur est insérée par technique de clonage classique, la séquence d'ALA10 fusionnée à la séquence GFP afin d'obtenir des lignées transformées appelées « ALA10-GFP » (ici ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2).

La transgénèse utilise les propriétés du plasmide Ti d' *Agrobacterium tumefaciens*, qui est capable de transférer un fragment d'ADN-T dans le génome de la plante. Après 4 semaines de culture, des plants sauvages d' *Arabidopsis* sont transformés en incubant leurs inflorescences dans une solution de 5% de saccharose (m/v) et 0,02% (v/v) du surfactant Silwett L-77, dans laquelle des *Agrobacterium tumefaciens*, contenant les constructions pEL103 avec la séquence d'ALA10-GFP, ont été remis en suspension. Les graines sont ensuite récupérées après maturation et les plants transformés sont sélectionnés sur milieu MS complété avec du saccharose (0,5% (p/v) ; agarose 0,8%(p/v) ; kanamycine 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, pH ajusté à pH5,7). La sélection de mutants homozygotes suit le protocole décrit ci-dessous (voir I.1.c). Les feuilles des plants résistants sont observées par microscopie confocale (voir III). Pour les études présentées dans ce mémoire, deux lignées ont été sélectionnées issues de la même plante initiale transformée pour une expression de type ALA10-GFP, cependant l'insertion du vecteur est différente, dû à un mécanisme aléatoire. Les mutants ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2 ont donc été obtenus et analysés.

3. Plantes porteuses de mutations induites par un traitement chimique en présence de méthanesulfonate d'éthyle (EMS)

La mutagenèse de 1,6 g (~ 80000 graines) de graines d' *Arabidopsis* Col^{er105}, de génération dite "M0" a été réalisée par Thierry Desnos (Laboratoire de Biologie du Développement des Plantes, iBEB, CEA Cadarache) par un traitement en présence de

méthanesulfonate d'éthyle (EMS) 0,2% pendant 16 heures. L'EMS est un agent alkylant qui induit des modifications chimiques des nucléotides, provoquant un mésappariement des bases de l'ADN et de ce fait des mutations ponctuelles. Dans la majorité des cas, l'EMS induit un changement de la base cytosine (C) en thymine (T). L'inactivation de l'EMS est faite avec du thiosulfate de sodium 1 M, puis 10 rinçages à l'eau. Un semis de la génération devenue M1 après la mutagenèse, est ensuite réalisé sur des barquettes de terreaux. Cent cinquante-six pools de graines de génération M2 sont récoltés à partir de 500 plantes de génération M1. C'est à partir de la génération M2 que le criblage décrit dans ce mémoire a été réalisé.

4. Croisements entre lignées d'*Arabidopsis*

Un croisement s'effectue entre 2 plantes afin d'obtenir une population hybrides, issue des génomes parentaux. Suite à la sélection de plantes d'écotype Col^{er105} porteuses de mutation(s) conférant une résistance à la galvestine-1 (criblage suivant la méthode décrite en II), les croisements ont été réalisés entre plantes résistantes et plantes non mutées (sauvages ou WT) d'écotype Col^{er105}. Le croisement est effectué entre un gamétophyte femelle (ou sac embryonnaire contenant l'oocyte) sauvage et un gamétophyte mâle (ou pollen), d'un mutant. Les plantes sont cultivées en parallèle afin de produire des fleurs matures de façon synchrone. Des boutons floraux de plantes sauvages prêts à s'ouvrir sont sélectionnés. Les étamines sont retirées soigneusement à l'aide de pinces fines, en écartant les pétales et les sépales (Figure M 1). Le pollen d'une fleur provenant d'un mutant est déposé à la surface du pistil d'une plante Col^{er105} ainsi préparée. La silique se forme 3 jours plus tard et est récoltée 4 semaines après le croisement. Lorsqu'un croisement est effectué entre une plante contrôle Col^{er105} et un mutant gali, on parle de rétrocroisement ou « backcross ».

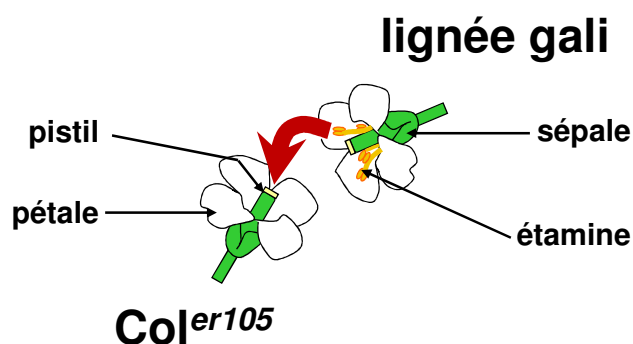


Figure M 1 : Schéma d'un rétrocroisement (ou « backcross ») entre une lignée gali et une plante contrôle (WT).

La cartographie de mutations générées par EMS repose dans une première étape sur l'obtention d'une population de recombinants entre deux écotypes différents (le principe de la cartographie est décrit en IV.1.d). Pour cela un croisement est réalisé entre une plante porteuse de mutation d'écotype Col^{er105} (gamétophyte mâle) et une plante WT d'écotype Ler (gamétophyte femelle). La silique se forme 3 jours plus tard et est récoltée 4 semaines après le croisement, fournissant ainsi les graines de génération F1 hybrides, issues des génomes parentaux.

II. Crible pour la sélection de mutants d'*Arabidopsis thaliana* résistants à la galvestine-1

Le principe et la mise au point du crible pour la sélection de mutants d'*Arabidopsis* résistants à la galvestine-1, inhibiteur de l'ensemble des MGDG synthases, sont décrits dans la partie résultats. Les lots de graines d'*Arabidopsis thaliana*, Col^{er105} (voir I.1.a.) issues d'une mutagenèse en présence de méthanesulfonate d'éthyle (EMS) ont été fournis pour ce travail par Thierry Desnos, Laboratoire de Biologie du Développement des Plantes, iBEB, CEA Cadarache. Ces lots de graines de génération M2 ont été obtenus à partir d'environ 500 plantes de génération M1 et ont été répartis en 156 lots. Le criblage a été réalisé en soumettant 50 de ces lots de graines, soit au total environ 100,000 graines correspondant à environ 150,000 mutations aléatoires dans le génome, à une pression en galvestine-1 de 100 μM , sur milieu gélosé préparé selon le protocole décrit plus haut (voir I.1.c.). Cinq-cent-quarante-cinq graines ont été semées par boîtes de pétri de 145 mm de diamètre. Les boîtes ont ensuite été placées à 4°C et à l'obscurité pour stratification pendant 2 jours, avant d'être transférées en chambre de culture en cycle long (humidité 60%, 22°C ; lumière blanche de densité de flux de photons de 70 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Pendant 3 jours, les boîtes ont été conservées à l'obscurité, permettant aux plantules de croître sans utiliser la photosynthèse, réduisant ainsi les effets de la galvestine-1 au niveau des chloroplastes, et en présence d'une teneur élevée en saccharose permettant une germination en conditions hétérotrophes. Après 3 jours, les plantules ont été soumises à une photopériode de 16h jours / 8h d'obscurité (lumière blanche de densité de flux de photons de 70 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Après 15 jours de culture, les plantes résistantes à la galvestine-1 sont restées vertes alors que les plantes sensibles sont devenues chlorotiques. Un crible secondaire a été mis en œuvre pour confirmer la résistance, en transférant les plantes sur un milieu gélosé avec une plus haute teneur en galvestine-1 (250 μM), durant 7 jours, et dans les

mêmes conditions de culture. Les plantes qui ne deviennent pas chlorotiques après ce second crible ont été sélectionnées, considérées comme étant résistantes à la galvestine-1, et soumises à des études de génétiques et d'analyses phénotypiques décrites dans la partie Résultats. Les lignées ont été nommées « gali » (**gal**vestine-1 insensitive).

III. Visualisation par Microscopie

Le phénotype des plantes est observé à différents niveaux, tout d'abord macroscopique en mesurant les écarts éventuels de croissance ou de développement des parties végétatives ou fertiles, ou les aberrations éventuelles de leur développement. De façon systématique, le phénotype est aussi analysé au niveau microscopique, de façon sommaire à l'aide d'une loupe binoculaire (Olympus SZX12), au grossissement X10 et X25. Des captures d'images sont réalisées à l'aide d'une caméra digitale Nikon DXm1200C et les traitements d'images sont réalisés à l'aide du logiciel ImageJ.

Des analyses plus fines sont réalisées à l'aide d'un microscope confocal (LEICA TCS-SP2), doté d'un système d'épifluorescence. Pour les parties végétatives chlorophylliennes, un fragment de feuille est coupée et montée entre lame et lamelle avec de l'eau. L'observation des chloroplastes se fait par autofluorescence de la chlorophylle, qui est excitée à 633 nm par un laser He-Ne. La fluorescence de la chlorophylle est collectée entre 658 et 700 nm. Des analyses ont été réalisées au grossissement X40, avec système d'immersion dans de l'huile. Des captures d'images sont réalisées à l'aide d'une caméra intégrée au microscope et les traitements d'images sont réalisés à l'aide du logiciel Leica confocal Software.

Une étude plus poussée du phénotype est envisagée pour les plantes les plus intéressantes, avec en particulier une caractérisation du profil glycérolipidomique membranaire (voir plus loin).

IV. Techniques d'étude des acides nucléiques

1. ADN

a) Extraction de l'ADN génomique de plantules isolées

L'extraction d'ADN d'une plantule d'*Arabidopsis* commence par le broyage d'une feuille collectée à un stade précoce de son développement (environ 5 mm, préalablement conservée à -80°C) dans du tampon d'extraction (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, Tris HCl pH 7,5 100 mM, EDTA 20 mM pH 8, β -mercaptoéthanol 0,2%) préchauffé à 60°C. L'échantillon est ensuite incubé au bain marie à 60°C pendant 30 min. Une centrifugation est ensuite réalisée pendant 10 min à l'aide d'une centrifugeuse de paillasse à vitesse maximale et température ambiante. Le surnageant est récupéré afin d'y ajouter un mélange de chloroforme/isoamylalcool (volume à volume). Une centrifugation est ensuite réalisée pendant 10 min à l'aide d'une centrifugeuse de paillasse à vitesse maximale et température ambiante avant de récupérer le surnageant. De l'isopropanol froid (volume à volume) est ajouté puis une incubation d'1 heure à -20°C est réalisée afin de précipiter l'ADN. Une centrifugation de 15 min à 4°C permet d'obtenir un culot d'ADN. Le surnageant est retiré et le culot lavé avec de l'EtOH froid (70%). Après une centrifugation de 5 min à 4°C, le surnageant est retiré et le tube est évaporé à sec par incubation dans une étuve à 37°C pendant 15 minutes. Le culot est repris dans 50 μ L de tampon TE (Tris HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM pH 8) puis la solution d'ADN génomique est dosée par mesure de l'absorbance à 260 nm, réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop2000 (Thermoscientific), permettant également de vérifier la pureté des échantillons. Sachant que la longueur d'onde d'absorption des protéines est à 280 nm, le rapport entre l'absorption de l'ADN et l'absorption des protéines (A_{260}/A_{280}) permet d'évaluer la contamination de l'échantillon en protéines. De la même façon, la longueur d'onde d'absorption des solvants utilisés lors de l'extraction d'ADN est à 230 nm. Le rapport entre l'absorption de l'ADN et l'absorption des solvants (A_{260}/A_{230}) rend compte de la contamination de l'échantillon en solvants. Les rapports A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} doivent être proches de 1.8 pour une qualité d'ADN optimale.

b) Extraction d'ADN génomique d'une population de 50 plantules pour séquençage NGS

Une population de 50 plantules homozygotes résistantes à la galvestine-1, issues de la génération F3 d'un croisement entre un mutant résistant et une plante contrôle d'un autre écototype (Ler), a été obtenue. Ces lignées homozygotes issues d'événements méiotiques indépendants, c'est à dire de 50 plantes différentes, ont été récoltés après avoir poussé 15 jours sur un milieu complété avec 100 μ M de galvestine-1. L'extraction des 50 plantules a été réalisée à l'aide du kit DNeasy Plant Maxi kit (24) (Qiagen) en suivant le protocole du fournisseur. Lorsque l'ADN génomique est extrait, une précipitation de l'ADN est alors réalisée en incubant sur la nuit avec 2 volumes d'EtOH 100%, NaCl 0,2 M à -20°C. Une centrifugation de 15 min à l'aide d'une centrifugeuse de paillasse à vitesse maximale est effectuée à 4°C. Le surnageant est retiré, puis le culot est lavé délicatement avec de l'EtOH 70% froid avant de centrifuger 5 min à l'aide d'une centrifugeuse de paillasse à vitesse maximale. Cette étape est répétée à nouveau. L'EtOH est ensuite enlevé au maximum et lorsque le culot est sec, il est repris dans du tampon TE contenant du Tris HCl 10 mM, pH 7.5 et de l'EDTA 1 mM, pH 8. Le dosage de l'ADN génomique est réalisé par mesure de l'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop2000 (Thermoscientific). Les rapports A_{260}/A_{280} (contamination en protéines) et A_{260}/A_{230} (contamination en solvant) doivent être proches de 1.8 pour une qualité d'ADN optimale (voir IV.1.a).

c) Amplification *in vitro* de fragments d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Conditions de PCR

Les fragments d'ADN ont été amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), à l'aide de la Taq polymérase "Advantage cDNA polymerase" (Clontech). L'ADN matrice est dilué dans 50 μ L de tampon Taq polymérase (composition établie par le fournisseur, Clontech), en présence de 5 mM de chaque désoxynucléotides, 10 μ M de chaque amorce et 0,5 μ L de Taq polymérase (concentration d'enzyme établie par le fournisseur, Clontech). Pour le séquençage des gènes codant pour les MGDG synthases, la Taq Phusion (Finnzymes) a été utilisée car cette enzyme a une plus haute fidélité de lecture et réplique avec une plus grande précision l'ADN, en faisant moins d'erreur. Les tubes contenant les mélanges ainsi réalisés ont été placés dans un incubateur programmable T100™ Thermal

Cycler (Biorad). L'amplification a été effectuée en plusieurs cycles comprenant trois étapes : une phase de dénaturation à 94°C, une phase d'hybridation de 65 à 53°C suivant le cycle et une phase d'élongation à 72°C. Le programme d'amplification utilisé est le suivant :

- 1 cycle de 1 min à 98°C
- 1 cycle de 20 sec à 98°C, 30 s à 67°C, 2 min à 72°C
- 1 cycle de 30 sec à 98°C, 30 s à 66°C, 2 min à 72°C
- 1 cycle de 30 sec à 98°C, 30 s à 65°C, 2 min à 72°C
- ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
- 1 cycle de 30 sec à 98°C, 30 s à 58°C, 2 min à 72°C
- 34 cycles de 30 sec à 98°C, 30 s à 57°C, 2 min à 72°C
- 1 cycle de 30 sec à 98°C, 30 s à 57°C, 5 min à 72°C

Après la réaction de PCR, 10 µL du mélange ont été complétées avec 2 µL de tampon de charge (glycérol 30 % (v/v), bleu de Bromophénol 0,25 % (p/v), xylène cyanol 0,25 % (p/v)) et les échantillons ont été déposés dans des puits d'un gel d'agarose 1% (p/v) contenant l'agent intercalant SybrSafe, permettant de visualiser les acides nucléiques, dilué au 10.000^{ème} dans du tampon TAE 0,5 x (Tris-Acétate pH 8 ; 20 mM ; EDTA 0,5mM). Une électrophorèse à 75 V a été conduite pendant 20 min, puis la visualisation des fragments liés au SybrSafe a été effectuée par illumination sous UV à l'aide d'un Molecular Imager Gel Doc XR (Biorad), permettant de contrôler la qualité de la PCR.

Amorces utilisées pour le génotypage du mutant ala10

Dans le but de vérifier que l'insertion de l'étiquette T-DNA est bien localisée dans le gène *ALA10*, une analyse par PCR a été réalisée à l'aide d'un jeu de 3 amorces permettant d'amplifier spécifiquement l'allèle sauvage ou l'allèle muté du gène d'intérêt. L'amorce située sur l'étiquette de l'ADN-T est sélectionnée suivant les instructions du SALK institute et située à l'extrémité gauche (LB). Cette amorce est utilisée de paire avec une autre amorce, localisée dans le gène *ALA10*, appelée ALA10 Rv. ALA10 Fw est la dernière amorce. Le couple ALA10Fw/ALA10Rv encadre le gène *ALA10* afin de l'amplifier.

Amorces utilisées pour le séquençage des gènes codant pour les MGDG synthases

L'ADN génomique des lignées gali a été extrait (voir IV.1.a) à partir de feuilles. Différents fragments chevauchants, d'environ 800 pb, des gènes codant pour les MGDG

synthèses ont été amplifiées par PCR (voir IV.1.c) avec les différents couples d'amorces (Figure M 2 et Tableau M 1). Ces fragments ont ensuite été purifiés à l'aide d'un kit Nucleospin Gel and PCR clean up (Macherey-Nagel) en suivant le protocole du fournisseur. Les fragments d'ADN purifiés ont alors été dosés par mesure de l'absorbance à 260 nm réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop2000 (Thermoscientific) (voir IV.1.a) puis dilués à une concentration de $5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ afin d'être envoyés pour séquençage par la société Eurofins Genomics. Les résultats ont été analysés par alignement avec une séquence provenant d'une plante contrôle (WT) d'écotype *Columbia* issue de la base de données du NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S.A.).

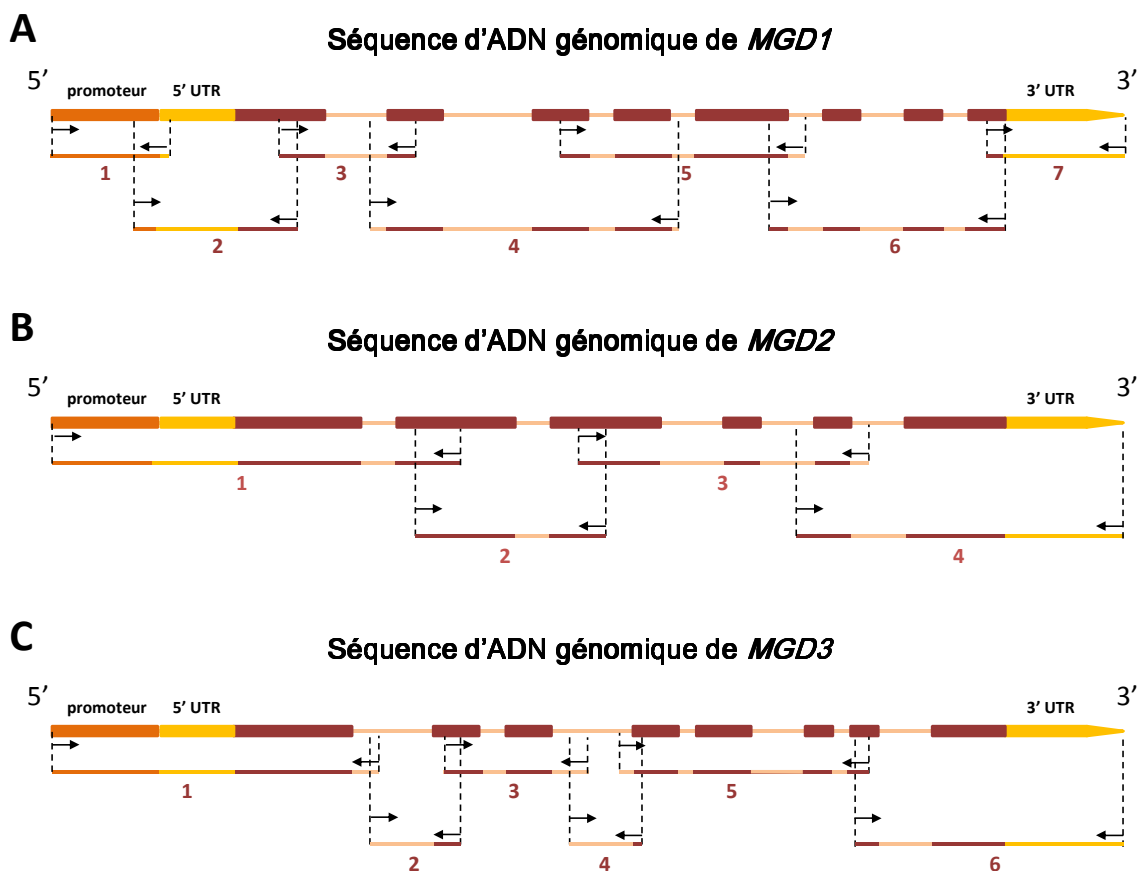


Figure M 2 : Stratégie de séquençage de *MGD1*, *MGD2* et *MGD3*. Les séquences des gènes codant pour les MGDG synthases et leurs décomposition en fragments selon les différentes paires d'amorces utilisées sont représentés. Les rectangles en oranges représentent les promoteurs, en jaune les 5'UTR et en rouge les exons. Les lignes roses représentent les introns. Les positions des amorces utilisées pour la PCR sont indiquées par des flèches qui bornent les fragments amplifiés (délimité par les pointillés). Le gène *MGD1* a été décomposé en 7 fragments délimités par 7 couples d'amorces différentes. Le gène *MGD2* a été décomposé en 4 fragments délimités par 4 couples de d'amorces différentes. Le gène *MGD3* a été décomposé en 6 fragments délimités par 6 couples de d'amorces différentes.

Matériel et Méthodes

Amorces	Séquences
MGD1 paire1 FW	CGTCTGAGTCGGATTATACTTCGTT
MGD1 paire1 RV	CACTGCTTTTGGCTAAACCGAA
MGD1 paire2 FW	GGTAGAAATTGCCCACAGAATATTCGG
MGD1 paire2 RV	GCCGATCAGCTTCAACACCATTC
MGD1 paire3 FW	GAGTGATGAGAATGGGATTAGGGAA
MGD1 paire3 RV	GGGCGTATGATCTGTCCACAAA
MGD1 paire4 FW	GTGAGCCATTGTTGATTTTGTTCGG
MGD1 paire4 RV	GCTAGGAATGATTCCAAAACCGACC
MGD1 paire5 FW	AGCACTTGCCATCCTACATGG
MGD1 paire5 RV	TCAGTGACTAACATCAAACGCCTAA
MGD1 paire6 FW	GTCCAGGTACTCTACATTTGTCAC
MGD1 paire6 RV	AGTGCAAGAGAGTTGAGGAAGACTA
MGD1 paire7 FW	TTTGGACCGGCATCGAAAGAG
MGD1 paire7 RV	AAGTCCCATGAAACAATGTCGTTCT
MGD2 paire1 FW	CACGATTCTTACGGCTGTCATCA
MGD2 paire1 RV	CCATAGCTGAACATGCTTCACCAT
MGD2 paire2 FW	GACAGGTAATTGTGAAGGATGTGTGG
MGD2 paire2 RV	CTCCCATCAGTAGAACC GCAC
MGD2 paire3 FW	GCGTTGTTTGATGGGCTTGATG
MGD2 paire3 RV	GATCTCAACCAACCTGTCCAGG
MGD2 paire4 FW	TACAAATCTTGCAGGCTGGACC
MGD2 paire4 RV	GCTTGGAAGATCCTAAGTCTCTGGA
MGD3 paire1 FW	GATCACCAACCAGCCACATAGAA
MGD3 paire1 RV	TGCGACAACCTTTAATATTGACGGCTG
MGD3 paire2 FW	CTTTGCCTTGAATCCAACGCATAG
MGD3 paire2 RV	CATAATAAGCGGCAAGAGCACTTAGA
MGD3 paire3 FW	CGACATGGAGAGACAGTACAAGTTC
MGD3 paire3 RV	TTAGGCGGAATTGTGAAGACTTCA
MGD3 paire4 FW	TTGAACTGGCCGTGTGTGA
MGD3 paire4 RV	AAGATGGGCGGACAGGTAAG
MGD3 paire5 FW	GTCCGGGTCAGGGTTTAAACATT
MGD3 paire5 RV	CCGGACCAGCCTGTTTTATGT

MGD3 paire6 FW	GTGACGTTTATAGGTTGAGGGTTTG
MGD3 paire6 RV	CTGAGATCGATGAAGTTGACACGTG
ZKT FW	ATAGGTTCAAGCTGGTCTCTCG
ZKT RV	CCTCACAAGTATGTATAGAGCCAAG
Mito FW	TTCAGAGAAGTTTGAGGATGACTG
Mito RV	GATTCAGAACAGAGTCAGGGTTGT
Core 2/1 FW	TCTGGTGTCAATCATGGTTTCTTC
Core 2/1 RV	GGACCAGAGGAAATAGAAGGAATAA

Tableau M 1 : Amorces utilisées pour le séquençage des MGDG synthèses

d) Séquençage Illumina à haut débit

Dans le but de localiser la mutation conférant la résistance à la galvestine-1 dans le génome les lignées *gali1* et *gali34*, un séquençage Illumina à haut débit a été réalisé par l'HiSeq2000, à partir d'ADN extrait de 50 plantules homozygotes (IV.1.b). Ce travail a été réalisé en collaboration avec Emeline Lhuillier (Plateforme Génomique de Toulouse, GeT-PlaGe). Plusieurs étapes sont nécessaires pour arriver au séquençage NGS (Next Generation Sequencing). La première étape consiste à créer une banque (ou librairie) de fragments d'ADN d'environ 500 pb liés à des adaptateurs. Ces fragments tapissent la surface de lecture du système HiSeq2000 (flowcell) (Figure M 3). La deuxième étape est un séquençage des fragments d'ADN, suivant une méthode similaire au séquençage de Sanger (Smith et al., 1986), mais qui utilise des bases liées à un fluorophore et bloquées (Austin et al., 2011). La détection du signal a été effectuée par une caméra intégrée au système HiSeq2000. Les données ont été enregistrées et nous ont été transmises pour analyse. Ce séquençage a couvert 50 fois le génome avec 30 Gb de données, permettant une cartographie très fine, précise et robuste. L'analyse bio-informatique a été réalisée par Benjamin Peret (Laboratoire de Biologie du Développement des Plantes, iBEB, CEA Cadarache) afin d'identifier le(s) gène(s) muté(s).

Préparation d'une population recombinante d'homozygotes résistants à la galvestine-1

La cartographie des mutants *gali* aidant à localiser les mutations dans le génome nécessite, dans une première étape, d'obtenir une population de mutants recombinants entre deux écotypes différents. Comme décrit précédemment, un croisement a été réalisé entre une

lignée gali d'écotype Col^{er105} (gamétophyte mâle) et une plante WT d'écotype Ler (gamétophyte femelle) (voir I.4), produisant une génération F1 d'hybrides entre les deux écotypes. Les plantes de génération F1 fournissent des graines de génération F2, dans lesquelles des phénomènes de recombinaisons ont lieu, consistants en des échanges d'une partie de matériel entre chromosomes d'une même paire ou « crossing over ». Une combinaison des séquences des deux écotypes s'opère sur chaque chromosome. Les graines de génération F2 ont été semées sur milieu gélosé contenant de la galvestine-1 à 100 µM (voir I.1.c). Après 15 jours de cultures, 150 plantules de génération F2, résistantes à la galvestine-1 ont été transférées en terres pour fournir des graines de génération F3. Chaque population F3 issue d'une plante F2 résistante, a été testée sur galvestine-1 à 100 µM. Après 15 jours de cultures, le pourcentage de F3 résistantes a été calculé et permet d'estimer si la plante F2 d'origine était homozygote (100% de plantes F3 résistantes) ou hétérozygote (75% de plantes F3 résistantes) puisque les mutations des lignées gali1 et gali34 sont dominantes. Une sélection de 50 plantules F3 homozygotes, provenant de 50 F2 homozygotes différentes, a été effectuée afin d'obtenir une population de plantes mutantes provenant d'événements méiotiques indépendants dans le but de multiplier et diversifier les phénomènes de crossing over. Les 50 plantules F3 homozygotes ainsi sélectionnées ont été conservées à -80°C jusqu'à extraction d'ADN pour préparation d'une banque de fragments.

Préparation d'une banque de fragments d'ADN

i. Fragmentation des ADN génomiques

La préparation d'une banque de fragments d'ADN se fait à partir de 4µg d'ADN extrait à partir de 50 plantules recombinantes homozygotes d'une lignée gali (voir IV.1.b). L'ADN génomique est ensuite fragmenté à l'aide d'un système ultrasonique Covaris M220 qui crée des fragments d'environ 500 pb en moyenne. Le contrôle de la fragmentation est effectué à l'aide d'un bioanalyser (Agilent), système d'électrophorèse miniaturisée sur gel qui contient un intercalant d'ADN, le Dye permettant de visualiser le profil des fragments et de contrôler la qualité ainsi que la quantité de l'ADN.

ii. Préparation de fragments et liaison aux adaptateurs

L'ensemble des manipulations suivantes, résumées ici, a été réalisé à la plateforme de génomique de Toulouse. Dans un 1^{er} temps, les fragments ont été purifiés par fixation sur billes magnétiques (v/v) ayant une affinité pour l'ADN. Un portoir magnétique a été utilisé pour attirer les billes sur la paroi du tube. Deux lavages ont alors été réalisés avec de l'EtOH

80%. Après évaporation de l'EtOH 80%, les billes ont été homogénéisées dans un tampon de resuspension puis le surnageant contenant l'ADN a été récupéré. Les fragments manipulés n'ont pas de bout franc. Une enzyme de type « end repair » a été utilisée pour compléter les séquences d'ADN manquantes sur chaque brin et obtenir des bouts francs (Figure M 4, a). Une phosphorylation en 5' a ensuite été réalisée puis les fragments ont été purifiés (Figure M 4, b). Une adénylation en 3' a alors été réalisée sur les fragments (Figure M 4, c).

Les adaptateurs ont environ 60 pb. Ils sont constitués d'une séquence de 6 nucléotides, appelée « index », qui permettra de les distinguer. Pour un échantillon, deux adaptateurs contenant un index différents sont utilisés. En aval de cet index, deux séquences différentes sont liées (Figure M 4, d ; séquences en vert et orange). Le but est d'obtenir après amplification un fragment avec 2 extrémités différentes pour le séquençage Illumina à haut débit. Les adaptateurs sont liés aux différents fragments par l'action d'une ligase (Figure M 4, d.). Deux purifications sur billes magnétiques ont alors été effectuées à la suite, avant une analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (0,8%) contenant l'intercalant SybrSafe, permettant de visualiser les fragments. A l'aide de marqueurs de taille (DNA ladder Invitrogen), les fragments autour de 500 pb ont été repérés et prélevés du gel.

L'étape suivante consiste à enrichir les fragments par une amplification par PCR (IV.1.c) avec des amorces correspondants aux adaptateurs. Cette étape permet d'amplifier les fragments qui ont intégrés les adaptateurs à leurs deux extrémités et d'augmenter la quantité d'ADN. Un nombre restreint de cycles PCR ont été effectués (10 cycles) afin d'éviter les biais dus à la polymérase, qui introduirait des erreurs au niveau de la séquence nucléotidique faussant ainsi le séquençage. Une purification sur billes magnétiques a ensuite été réalisée comme décrit plus haut. Enfin, un contrôle qualité a été effectué sur la banque nouvellement créée (taille des fragments, pureté et quantité) à l'aide d'un système bioanalyser, comme décrit précédemment.

Les fragments ont été amplifiés par PCR quantitative en temps réel (Q-PCR) permettant une quantification à l'aide de l'intercalant d'ADN SybrGreen (SYBR Green Jumpstart Taq ReadyMix, Sigma-Aldrich). Cet intercalant fluoresce en effet de façon proportionnelle à son insertion dans la double hélice d'ADN; l'intensité du signal a alors été mesurée et une quantification relative effectuée. Les amorces utilisées sont celles correspondant aux adaptateurs.

Séquençage à haut débit à l'aide du système Illumina HiSeq2000

i. Présentation succincte du système Illumina HiSeq2000

Le séquençage par synthèse avec l'HiSeq2000 consiste à séquencer la banque de fragments d'ADN par une méthode similaire à celle de Sanger (Smith et al., 1986), mais qui utilise des bases liées à un fluorophore et bloquées. Ce système est composé d'une surface de lecture, appelée "flow cell", subdivisé en 8 pistes (appelées "lanes") (Figure M 3). L'échantillon contenant la banque de fragments d'ADN nouvellement créée est déposé dans une piste. Le processus qui suit fixe les fragments à la surface de la piste et copie chaque fragment environ 2000 fois, formant ainsi un agrégat qui amplifie le signal de lecture des bases modifiées. La détection du signal se fait à l'aide d'une caméra intégrée au système HiSeq2000. Les données nous ont été transmises pour analyse bio-informatique, réalisée par Benjamin Peret (Laboratoire de Biologie du Développement des Plantes, iBEB, CEA Cadarache), afin d'identifier le(s) gène(s) muté(s).

ii. Formation d'agrégats

Les échantillons sont injectés au niveau de l'extrémité de chaque piste de la surface de lecture. Une phase d'amplification visant à fixer les fragments a été effectuée et a créé 2000 copies identiques de chaque fragment, formant ainsi un agrégat. Environ dix millions d'agrégats ont été formés par centimètres carrés. Les deux brins matrices ont été séquencés sur 100 pb; ce type de séquençage est appelé « paired end », 2 X 100 pb. Le fait de séquencer les deux brins matrice apporte un plus grand nombre de données comparé à un séquençage à partir d'un seul brin. Ainsi 30 Gb de données informatiques sont collectées, fournissant une cartographie précise et robuste.

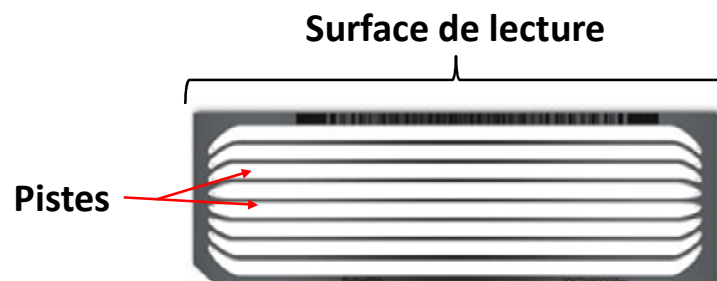


Figure M 3 : « Flow cell » de l'HiSeq 2000. La surface de lecture de l'HiSeq2000 est subdivisée en 8 pistes de lectures. Les échantillons ont été injectés au niveau de l'extrémités des pistes.

Pour commencer, les fragments ont été dénaturés, puis les brins se sont fixés aux amorces qui tapissent la surface de lecture (Figure M 4, e). Une extension a été réalisée à partir de l'amorce fixée au brin hybridé, qui a servi dans ce cas de matrice (Figure M 4, f). Une dénaturation des brins a eu lieu à nouveau (Figure M 4, g.) et un pont s'est formé entre le nouveau brin fixé à la surface de la lecture et une amorce correspondant à l'extrémité opposée (Figure M 4, h). Une extension a eu lieu à nouveau, créant ainsi un pont double brin (Figure M 4, i). Une dénaturation a alors été effectuée, d'autres ponts se sont créés avec les amorces opposées et une extension supplémentaire a été réalisée (Figure M 4, j). Ainsi, les deux brins matrices ont été fixés à la surface de lecture et leurs amplifications ont formé des agrégats. Le séquençage est dit de type « paired end » car les deux brins matrices ont été séquencés. Ce procédé a été répété sur 35 cycles pour donner des agrégats individualisés contenant 2000 molécules.

iii. Séquençage par synthèse

Le brin reverse a ensuite été clivé et l'extrémité 3' a été bloquée pour éviter une extension supplémentaire (Figure M 4, k et l). Les amorces correspondant aux amorces fixées sur la surface de lecture se sont hybridées et pour permettre l'élongation du brin complémentaire (Figure M 4, m). A chaque cycle du séquençage par synthèse, un désoxynucléoside triphosphate (dNTP) marqué (ou base marquée) par un fluorophore a été ajouté à la séquence du brin néoformé (Figure M 4, n). Ces dNTPs (Adénine, Cytosine, Guanine, Thymine) ont été modifiés pour être des terminateurs pour la polymérisation. Le signal de fluorophore, spécifique de chaque type de dNTPs nouvellement incorporé, a été "lu" à l'aide d'une caméra intégrée à l'HiSeq2000 (Figure M 4, o). Cette étape a permis l'identification de chacune des bases qui a ensuite été débloquée, permettant un nouveau cycle d'incorporation d'autres bases, et pour finir, le fluorophore a été clivé (Figure M 4, p). Les bases ont donc été incorporées une à une en lisant leur signal individuellement (Figure M 4, q). Ce processus a été répété sur environ 200 cycles pendant 15 jours.

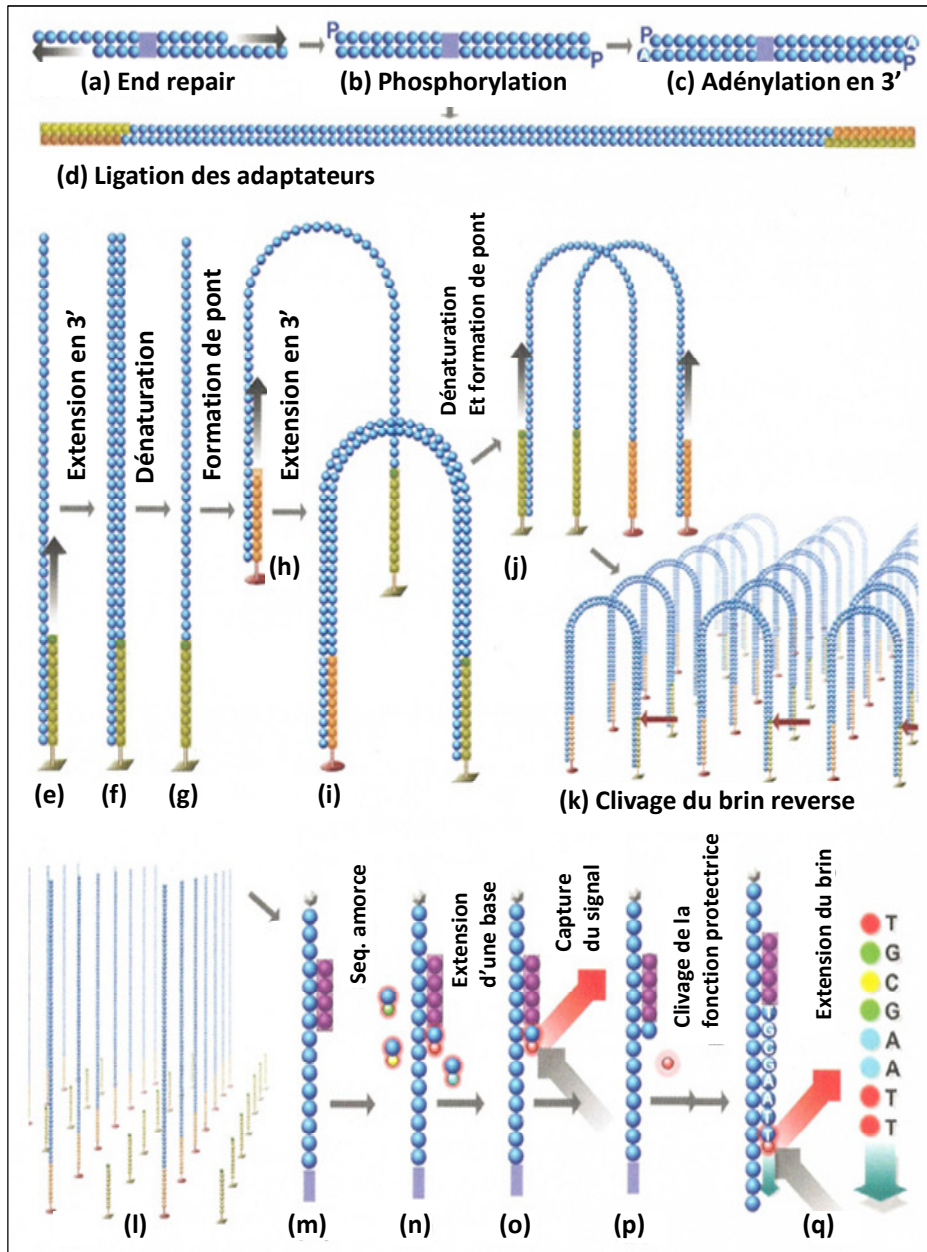


Figure M 4 : Processus du séquençage à haut débit (Illumina HiSeq2000). Le séquençage à haut débit est un processus en plusieurs étapes: tout d'abord la création d'une librairie de fragments d'ADN de 500 pb liés à des adaptateurs (a, b, c et d), ensuite la formation d'agrégats individualisés contenant 2000 molécules identiques (e, f, g, h, i, j, k et l) et enfin le séquençage réalisé à partir des agrégats (m, n, o, p et q).

iv. Analyse bio-informatique des résultats du séquençage NGS

Le séquençage par synthèse a généré environ 50.000.000 lectures ou « reads » (Figure M 5). Chaque lecture a une taille de 100 pb et est appariée (paired-end) avec une autre lecture issue du séquençage de l'autre extrémité du fragment séquencé (insert). La taille moyenne des inserts a été d'environ 400 pb. L'appariement des lectures a permis d'augmenter leur

probabilité d'être cartographiées et facilite l'identification d'indels (même si cette dernière propriété n'a pas été utilisée pour la détection de mutations de type EMS).

Les lectures ont été cartographiées sur le génome de référence d'*Arabidopsis* (version TAIR9, ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Sequences/whole_chromosomes/OLD/TAIR9_chromosome_file/) en utilisant le logiciel MAQ (<http://maq.sourceforge.net/maq-man.shtml>) avec les paramètres par défauts pour une analyse de type "paired-end" (Li et al., 2008; Li and Durbin, 2009). De plus, le logiciel MAQ est destiné à aligner un nombre limité de lectures (quelques millions), ce nombre limité de lectures permet également de travailler avec un ordinateur de bureau (iMac 2.7GHz Intel Core i5 16Go RAM). Les lectures ont donc été décomposés par paquets de 5 millions puis cartographiés séparément en utilisant la fonction *match*. Les fichiers de cartographie ont ensuite été assemblés grâce à la fonction *mapmerge* de MAQ.

Les SNPs (Single Nucleotide Polymorphisme) sont des marqueurs moléculaires des séquences d'ADN, il s'agit d'un polymorphisme mononucléotidique entre différents écotypes. Le croisement de la lignée gali (écotype *Columbia* avec une plante d'un écotype différent (*Landsberg erecta*) a introduit une grande quantité de SNP dans la population séquencée (population de mapping). La sélection de plantes homozygotes pour la mutation étudiée a introduit un biais dans la répartition des SNPs. En effet, la probabilité d'obtenir un SNP dans la population séquencée est de 50% alors qu'à proximité de la mutation (dans la zone où le génome est homozygote pour la mutation, donc conservée au sein de cette population) cette probabilité tend vers 0. C'est cette propriété qui est à la base de l'approche de mapping et qui explique la présence d'un désert de SNP dans la zone d'intérêt. Une fois la cartographie des lectures effectuée par le logiciel MAQ, la liste des SNPs a été produite en deux étapes : un fichier consensus (fonction *assemble*) puis une extraction de la liste de SNPs (fonction *cns2snp*). Un fichier *pileup* a été généré en parallèle (fonction *pileup*); il contient le détail des résultats de séquençage base par base pour chaque position du génome (Figure M 5, B). Les fichiers .cns et .pileup ont ensuite été assemblés en un fichier .emap grâce au script PERL décrit par Austin et al., 2008 (MAQ2NGM.pl). Le fichier .emap final a enfin été chargé sur le site <http://bar.utoronto.ca/NGM/> pour analyse et identification des candidats.

La fréquence des SNPs dans la population de mapping a montré des variations naturelles reproductibles sur chaque chromosome. La région non recombinante, possédant la mutation d'intérêt, est identifiable par un désert de SNPs. Cette région comprenant une

absence de SNPs aide à trouver des gènes candidats comprenant des mutations qui pourraient correspondre à celle qui est responsable du phénotype d'intérêt.

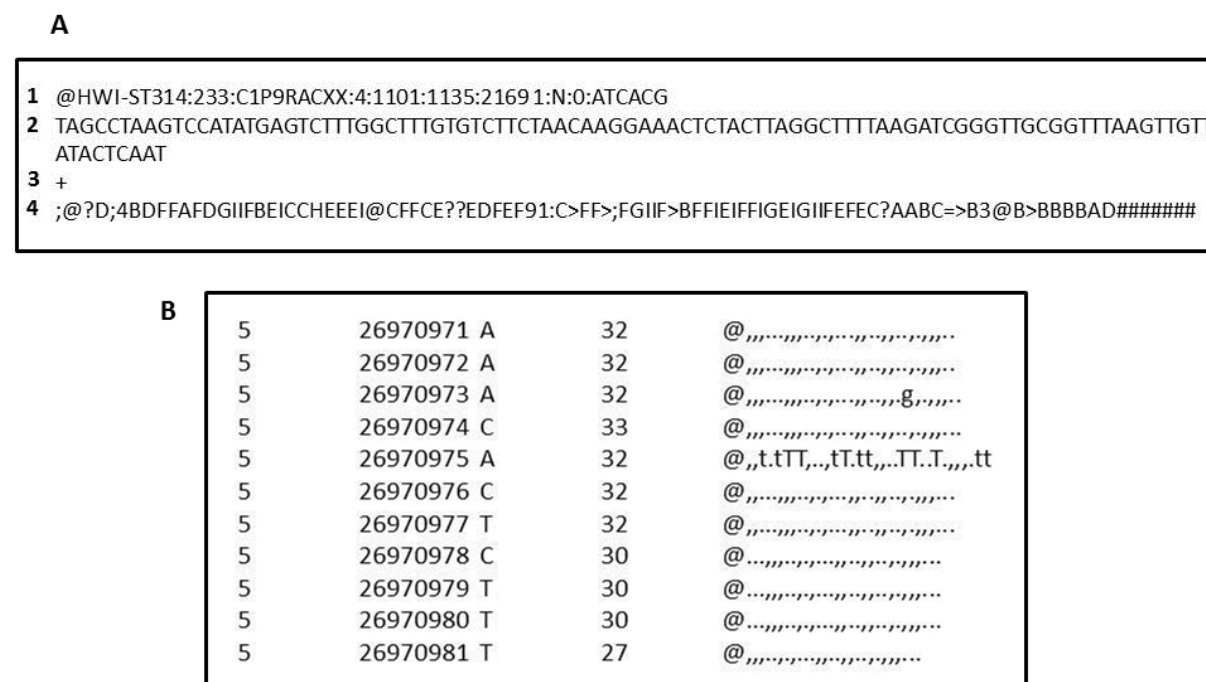


Figure M 5 : Analyse bio-informatique. A) **Exemple de lecture** ou *read*, toujours représentée avec 4 lignes : 1. l'identifiant de séquence ; 2. la séquence ; 3. un séparateur et 4. le code qualité de la séquence. B) **Exemple aléatoire issu d'un fichier pileup** (taille du fichier d'environ 5 Go par mutant). Un SNP est présent à la position 26970975 du chromosome 5.

2. ARN

a) Extraction des ARN

Les ARN ont été extraits à partir de plantules congelées à -80°C à l'aide d'un kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) suivant le protocole du fournisseur, à partir de plantules broyées dans de l'azote liquide. Le dosage des ARN totaux a été effectué par mesure de l'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop2000 (Thermoscientific), permettant également de vérifier la pureté des échantillons. Sachant que la longueur d'onde d'absorption des protéines se situe à 280 nm, le rapport entre l'absorption de l'ARN et l'absorption des protéines (A_{260}/A_{280}) permet d'évaluer la contamination de l'échantillon en protéines. De la même façon, la longueur d'onde d'absorption des solvants utilisés lors de l'extraction d'ARN est à 230 nm. Le rapport entre l'absorption de l'ARN et l'absorption des solvants (A_{260}/A_{230}) rend compte de la contamination de l'échantillon en solvants. Les rapports A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} doivent être proches de 1.8 pour une qualité d'ARN optimale.

b) Elimination de l'ADN contaminant par digestion en présence de DNase

La digestion de l'ADN génomique contaminant les échantillons enrichis en ARN a été réalisée à l'aide du kit Turbo DNA free (Ambion 1907) à partir de 10 µg d'ARN totaux obtenus lors de l'extraction, ajusté dans un volume de tampon Turbo DNase (1X). L'enzyme turbo DNase a été ajoutée à une concentration finale de 2 U.µL⁻¹. Une incubation à 37°C pendant 30 min a été effectuée puis l'enzyme Turbo DNase a été inactivée par le DNase Inactive Reagent (0.1 volume). Une incubation de 2 min à température ambiante a été effectuée avant une centrifugation à 10.000 g pendant 1.5 min à 4°C. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube puis un dosage a été effectué par mesure de l'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop2000 (Thermoscientific). Les rapports A_{260}/A_{280} (contamination en protéines) et A_{260}/A_{230} (contamination en solvant) doivent être proches de 1.8 pour une qualité d'ARN optimale (voir IV.2.a). Enfin 2 µg d'ARN totaux complétés de tampon de charge (1X) ont migrés sur une électrophorèse à 75 V pendant 20 min sur gel d'agarose (1% p/v) contenant du TAE 0.5X et l'intercalant SybrSafe dilué au 10.000^{ème} puis ont été analysés. La présence de SybrSafe a permis de visualiser le profil des ARN totaux et vérifier l'efficacité de l'extraction, à l'aide du système UV Molecular Imager Gel Doc XR (Biorad).

c) Rétro transcription à partir d'ARN totaux

La rétrotranscription a permis de générer un ADN complémentaire (ADNc) à partir d'un ARN, à l'aide d'une enzyme appelée rétrotranscriptase. Les ARN totaux (1 µg) ont été rétrotranscrits à l'aide du kit Verso cDNA Kit (Thermo Scientific). Des oligo dT ont été incubés 5 min à 70°C pour enlever les structures secondaires puis dans la glace pour permettre aux oligo dT de s'hybrider avec les ARN. Le mix contenant le tampon rétrotranscriptase M-MLV RT (composition établie par le fournisseur) 1X, les 4 dNTP 10 mM, RNAsin et M-MLV Reverse Transcriptase (100 U)) a été ajouté et le mélange a été incubé 60 min à 40°C puis 15 min à 70°C pour inactiver l'enzyme. Pour finir 180 µL d'eau ont été ajoutés pour obtenir une concentration d'ADNc à 5 ng.µL⁻¹. L'efficacité de la rétrotranscription a été vérifiée par PCR en amplifiant un fragment d'environ 200 pb de l'ADNc de l'actine 8 (voir amorces Tableau M 2). Enfin 2 µg d'ADNc ont migrés sur une électrophorèse à 75 V pendant 20 min sur gel d'agarose (1% p/v) contenant du TAE 0.5X et

l'intercalant SybrSafe dilué au 10.000^{ème} puis ont été analysés. La présence de SybrSafe a permis de visualiser le profil des ADNc à l'aide du système UV Molecular Imager Gel Doc XR (Biorad).

d) PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel (RT-QPCR) a permis de quantifier relativement les ADNc. En effet le SYBR Green (Jumpstart Taq ReadyMix, Sigma-Aldrich) est un intercalant de l'ADN qui s'est incorporé au fur et à mesure de l'élongation des brins, à chaque cycle de la PCR. Le signal fluorescent émis par le SYBR Green est proportionnel à la quantité d'ADN (RotorGene RG-3000, Corbett Research). Les échantillons ont été utilisés à une dilution de 1/25 et les amorces servant pour différentes PCR ont été représentées dans le Tableau M 2. L'ADNc a été dilué dans 7,5 µL de Mix Sigma contenant l'enzyme Taq polymérase, les 4 dNTP et le SYBR Green, complété de 10 µM de chaque amorce. Le programme d'amplification utilisé a été le suivant :

- 1 cycle de 2 min à 95°C
- 40 cycles de 15 sec à 95°C, 15 s au T_m (température maximale pour l'hybridation, melting temperature) des amorces (Tableau M.2), 30 sec à 72°C

Matériel et Méthodes

Amorces	Séquences	T _m (°C)
actine 8 Fw	CGCCGATGGTCGTACAACCGGTAT	61
actine 8 Rv	TCCCGTTCTGCTGTTGTGGTGAACA	61
ala10 Fw	CGCGGGTAAGGCTTATGGACGCGG	60
ala10 Rv	TCTGCAACACGGCAGCCTCAGGC	60
dgd1 Fw	GAGGCTAAGGATGTCCCTCCGTTGG	64
dgd1 Fw	TGCTTGTGCAGATGGCAGACGC	64
dgd2 Fw	TGTCCGCCAGTGGCTTGAGGA	64
dgd2 Rv	CCTCGAGGACAGCAATGTCTGCCT	64
eif4A Fw	TGCTCCAGCATGGCAGGATCTGC	63
eif4A Rv	AAGACCCATGGCATCAAAGCTCTCA	63
mgd1 Fw	GCCCTGGCCGTTCAACCAGC	62
mgd1 Rv	CCCTTGGGCGATTTCCCTGGCA	62
mgd2 Fw	TCCTACTTGTTTCATCCGGGGGT	62
mgd2 Rv	CCTTCACCAAAACCGCTCGTGC	62
mgd3 Fw	ATGCGGCCGGAACAAAGTCCT	63
mgd3 Rv	TCGTACCCGGACCAGCCTTAGTG	63
pldγ1 Fw	TGGCTGAGGTGGCTTCCGAG	67
pldγ1 Rv	CTGGCAGCACAAAGACAATGCAAATG	67
pldζ2	CCGCGAATGCCGTGGCAGAT	61
pldζ2	ACCATGTGGTGGTGAGGCATCAACA	61

Tableau M 2 : Amorces utilisées pour la RT-Q-PCR

V. Techniques d'étude des protéines

1. Analyse des protéines par électrophorèse

Les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), technique qui permet de séparer les polypeptides en fonction de leur poids moléculaire après migration dans un gel polyacrylamide.

Les concentrations des extraits protéiques ont été initialement déterminées selon la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951). Le dosage a été effectué par comparaison avec une

gamme étalon réalisée pour chaque série avec la BSA (Sérum Albumine Bovine). Suite au dosage, les protéines ont été reprises à 1 µg/µL dans du tampon de dépôt (50 mM Tris-HCl pH 6.8, saccharose 10 % (m/v), 2 %, SDS 2% (m/v), Bleu de bromophenol 0.01 % (m/v), DTT 25 mM pH 6.8) et ont été incubées à 95°C pendant 5 min.

Le gel de polyacrylamide est constitué d'un gel de concentration contenant 5% (v/v) d'acrylamide et d'un gel de séparation contenant 12 % (v/v) d'acrylamide. Pour le dépôt, 20 µg de protéines ont été chargés et l'électrophorèse a été conduite à voltage constant (130 V) dans du tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,2 % (m/v), pH 8,3). Après l'électrophorèse, les protéines ont été soit transférées sur membrane de nitrocellulose pour permettre un immuno-marquage avec un anticorps spécifique, soit colorées au Bleu de Coomassie. Pour la coloration au Bleu de Coomassie, les protéines du gel ont été fixées dans un mélange isopropanol/acide acétique (3:1, v/v) pendant 30 min avant d'être colorées sur la nuit dans du milieu de coloration (sulfate d'ammonium 1.3 M, méthanol 34 %, acide acétique 0.5 %, Bleu de Coomassie Brilliant G-250, 0.1 % (m/v) Sigma-Aldrich). Le gel a ensuite été décoloré dans de l'eau distillée par des lavages successifs jusqu'à obtenir le contraste souhaité.

2. Electrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Les polypeptides séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes ont été transférées électriquement du gel sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Biosciences) à 100 V pendant 75 min à 4°C dans du tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM, , SDS 0.1% (m/v), éthanol 20%, pH 8,3). La membrane de nitrocellulose a ensuite été rincée à l'eau. L'efficacité du transfert et la position des marqueurs de poids moléculaire (Amersham) ont été vérifiées par coloration des protéines au rouge Ponceau 0, 2% (m/v) dans TCA 3 % (v/v). La décoloration de la membrane a été effectuée dans du tampon de TBS (Tris-HCL 20 mM, NaCl 0.9 % (m/v), pH 7.5).

3. Immunomarquage

La membrane de nitrocellulose a été initialement saturée en protéines dans un tampon TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 9 g/L, pH 7,5) contenant du lait écrémé déshydraté 5 % (m/v), pendant 1h, sous agitation et à température ambiante. La membrane a ensuite été incubée à 4°C pendant 16 h dans une solution de TBS-lait 5 %, contenant l'anticorps primaire de lapin spécifique de la protéine ALA10 dilué au 1/50^{ème}. L'anticorps dirigé contre ALA10 reconnaît une séquence C-terminale de la protéine. La fixation non spécifique de l'anticorps a été éliminée préalablement par trois lavages successifs de 10 min de la membrane dans un tampon de TBS. La membrane a ensuite été incubée 1 h dans du TBS-lait 5% contenant l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à une enzyme peroxydase du radis noir (HRP), dilué au 1/20000^{ème} dans du TBS.

Après incubation en présence du second anticorps, la membrane a été lavée à deux reprises pendant 10 min dans un tampon de TBS-tween 0,1 % et une fois pendant 10 min dans un tampon TBS. Le complexe protéine/anticorps primaire/anticorps secondaire a été révélé à l'aide de luminol, un substrat chemiluminescent de la HRP. La réaction chemiluminescente est réalisée par la catalyse de l'oxydation du luminol par la HRP, produisant de la lumière. Les membranes ont été incubées 2 min dans une solution de luminol (Tris-HCL 100 mM, p-coumaric acid 0.4 mM, peroxide hydrogen 0.02 %, luminol 2.5 mM, pH 8.5). Un film autoradiographique sensible à la lumière émise (Hyperfilm ECL, Amersham) a ensuite été appliqué contre la membrane pendant des temps d'exposition variable (de 30s à 10 min) puis a été développé. Le temps d'exposition est ajusté pour permettre l'obtention d'un signal non saturant.

VI. Analyse de glycérolipides membranaires

1. Extraction de glycérolipides selon Folch

Les études présentées dans ce mémoire comprennent des analyses phénotypiques primaires, au niveau de la croissance et des phases du développement, et pour certaines plantes modifiées au niveau de gènes ayant potentiellement un rôle dans l'homéostasie des lipides (mutants *ala10*, lignées *gali*), des analyses phénotypiques approfondies au niveau du glycérolipidome.

Environ 100 mg de rosette d'*Arabidopsis* préalablement lyophilisées ont été broyées dans de l'azote liquide et ont été transférées dans 4 mL d'éthanol bouillant pendant 5 min à 70°C afin de bloquer l'action des lipases présentes dans l'échantillon. Après addition de 2 mL de méthanol et 8 mL de chloroforme, l'extrait a été incubé 1 h sous agitation et bullage sous argon. L'extrait a ensuite été soumis à une filtration, une addition de 3 mL de chloroforme/méthanol (2:1, v/v) et 17 mL de NaCl 1%, puis le mélange a été bullé sous argon. Une centrifugation de 20 min à 112 g a permis la formation d'une biphase. La phase inférieure contenant les lipides a été récupérée puis évaporée sous argon et les lipides ont été stockés à -20°C. Pendant l'ensemble de ces manipulations, les suspensions ont été maintenues sous argon pour éviter leur oxydation.

2. Séparation et dosage des lipides totaux

a) Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince ou CCM repose sur des phénomènes d'adsorption différentielle : une phase mobile constituée de solvant progresse le long d'une phase stationnaire (silice) fixée sur une plaque de verre. Les différentes classes de glycérolipides membranaires sont séparées par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice (silica gel 60, Merck).

Les lipides conservés à -20°C ont été repris dans 980 µL de chloroforme et un volume correspondant à 200 µg de lipides a été prélevé de la solution, transféré dans un autre tube et évaporé sous argon. Les lipides ont alors été repris du chloroforme puis ont été déposés sur une plaque de silice et le dépôt a été séché sous argon.

Les solvants utilisés pour la CCM ont été le chloroforme, l'acétone, le méthanol, l'acide acétique et l'eau, les proportions étant indiquée sur la Figure M 6.

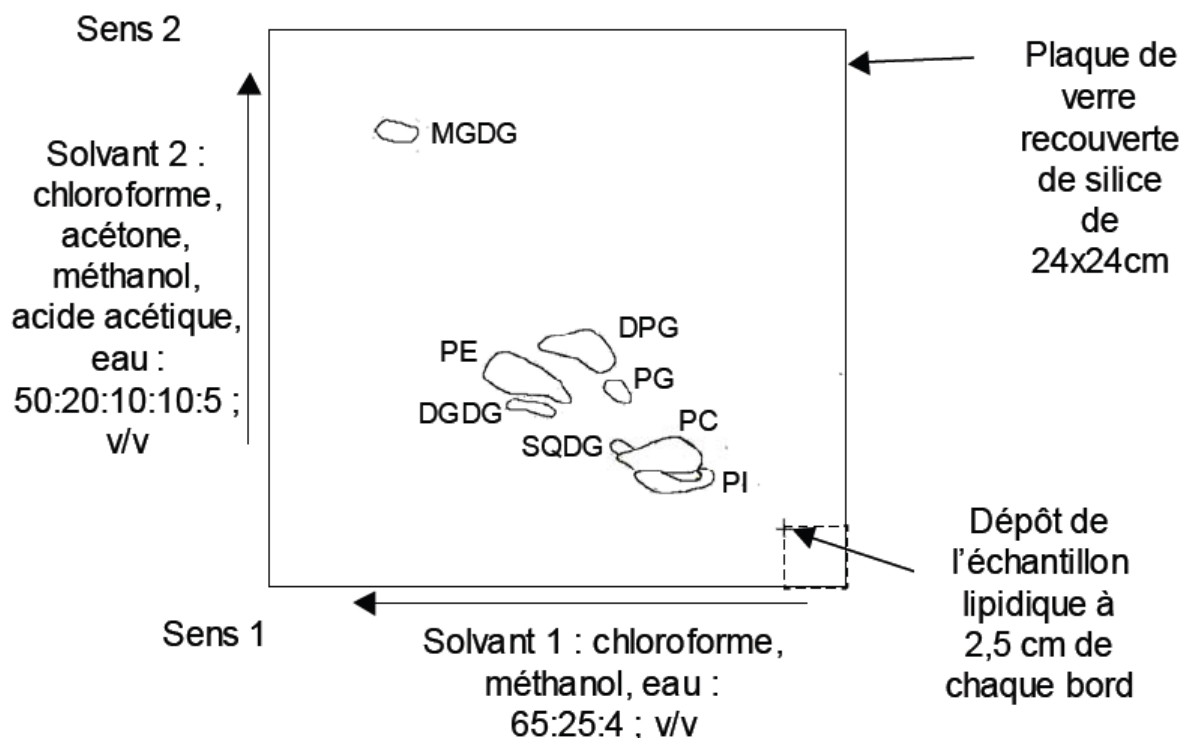


Figure M 6 : Analyse de lipides par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince (conditions d'après Douce et al., 1990)

Entre les deux sens de migration, les plaques ont été conservées sous argon afin d'assurer le séchage de la couche de silice et d'éviter une mauvaise migration des lipides dans le deuxième sens. Après migration, les différents lipides ont été visualisés avec l'imageur TLC visualizer (Camag) sous lumière ultra violette, après pulvérisation d'ANS (acide 8-anilino-1-naphtalène-sulfonique 0,2% (p/v) dans le méthanol). Les lipides ont été identifiés en comparant leurs caractéristiques de migration à celles de lipides témoins chromatographiés dans les mêmes conditions.

b) Méthanolyse des groupements acyls de chaque classe glycérolipidique

Les différentes classes glycérolipidiques identifiées précédemment ont été individualisées sur la plaque de silice, récoltées par grattage de la plaque et transférées dans des tubes en verre à fermeture hermétique à l'aide de bouchons à vis. Une addition d'acide gras à 21 atomes de carbone, ou C21:0 (10 µg) a été effectuée puis 3 mL de milieu de méthanolyse (H₂SO₄ (24N) 2.5% dans du méthanol) sont ajoutés. Le mélange a été agité à

l'aide d'un vortex avant d'être incubé 1 h à 100°C. La réaction de méthanolyse de la liaison ester des acides gras a été arrêtée par l'ajout de 3 mL d'eau et 3 mL d'hexane. Le mélange a été agité à l'aide d'un vortex puis a été mis à reposer pendant une nuit à 4°C, permettant la formation d'un biphasé. La phase supérieure contenant les lipides a été extraite et transférée dans un nouveau tube puis évaporée sous argon. De l'hexane a été à nouveau ajouté (3 mL) à la solution méthanolysée pour extraire à nouveau la phase supérieure après 30 min de formation de la biphasé à température ambiante. La phase supérieure ainsi transférée a été évaporée sous argon puis stockée à -20°C.

c) Dosage des lipides totaux par chromatographie en phase gazeuse

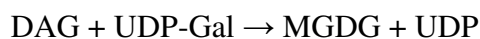
Les méthyl-esters d'acides gras (FAMES, fatty acid methyl esters) issus de la méthanolyse et conservés à -20°C ont été repris dans 200 µL d'hexane puis évaporés sous argon. Ensuite ces mélanges de FAMES ont été à nouveau repris dans 10 µL d'hexane puis injectés dans les mini tubes destinés à la chromatographie en phase gazeuse (Clarus 580 GC, PerkinElmer). Le gaz vecteur permet de véhiculer les molécules de l'échantillon dans la colonne (colonne de cyanopropyl polysilphènesiloxane BPX70 SGE, détecteur par ionisation de flamme, gaz vecteur azote, température croissante de 130 à 180°C). Ainsi les différents acides gras ont été identifiés en comparant les temps de rétention de leurs esters méthylés avec ceux de témoins ; ce temps dépend du nombre de carbone et du degré d'insaturation de la molécule considérée. La quantification des acides gras méthylés composant le mélange injecté a été rendu possible par addition avant méthanolyse d'une quantité connue d'un acide gras C21:0 comme témoin interne.

Chapitre 1 : Criblage d'une collection
de mutants *d'Arabidopsis*, générés par
traitement en présence de
méthanesulfonate d'éthyle, pour
l'identification de lignées résistantes à la
galvestine-1

Chapitre 1 : Criblage d'une collection de mutants d'*Arabidopsis*, générés par traitement en présence de méthanesulfonate d'éthyle, pour l'identification de lignées résistantes à la galvestine-1

I. Introduction

Chez les plantes, le chloroplaste est l'organe subcellulaire siège de la photosynthèse, fixant le carbone atmosphérique et de ce fait jouant le rôle de moteur de la croissance photoautotrophique, impliqué aussi dans la fixation de l'azote et du soufre et dans diverses voies métaboliques essentielles. L'enveloppe qui limite le chloroplaste participe activement à la biogenèse de cet organe en étant en particulier le site de biosynthèse de la majeure partie des lipides plastidiaux, notamment les galactolipides. Ceux-ci représentent environ 80% des lipides des membranes photosynthétiques (Joyard and Douce, 1982), soit 50 % des lipides totaux de la plante (Jouhet et al., 2007). Les galactolipides sont d'une part des composants pour former la matrice membranaire des thylacoïdes et jouent d'autre part des rôles plus spécifiques, interagissant en particulier avec des complexes protéiques tels que les photosystèmes (voir Partie Bibliographique) (Boudiere et al., 2013). La synthèse du galactolipide majeur, le MGDG, est catalysée par une activité UDP-galactose 1,2-diacylglycérol 3 β -D-galactosyltransférase, appelée aussi MGDG synthase. La réaction catalysée par les MGDG synthases consiste à transférer un résidu galactosyl (Coves et al., 1988) sur un accepteur, le DAG :



Chez *Arabidopsis*, il existe une famille multigénique de 3 MGDG synthases classifiées en MGDG synthases de type A ou de type B (Awai et al., 2001). Le type A a été défini par la présence d'une séquence d'adressage N terminale canonique des plastes (un transit peptide) clivé après import par le translocon (Awai et al., 2001). Chez *Arabidopsis*, il n'existe qu'une MGDG synthase de type A, MGD1, localisée dans la membrane interne de l'enveloppe et responsable de la synthèse de la majeure partie du MGDG nécessaire à l'élaboration des thylacoïdes. Les MGDG synthases de type B, MGD2 et MGD3, ont été définies par la présence d'une séquence courte en N terminal qui ne présente pas les caractéristiques d'un

peptide de transit classique. MGD2 et MGD3 sont localisées dans la membrane externe de l'enveloppe (Awai et al., 2001). Les gènes *MGD2* et *MGD3* sont surtout exprimés dans des tissus non-chlorophylliens et dans certaines conditions environnementales telles qu'en carence de phosphate (Awai et al., 2001).

La synthèse du MGDG est une réaction majeure du métabolisme fournissant des lipides pour la biogenèse des membranes. Il a aussi été montré que dans certaines conditions, telles que lors de stress au froid, les galactolipides pouvaient servir de précurseurs pour la production de triacylglycérol (TAGs). Dans certains processus de signalisation, les acides gras polyinsaturés liés aux galactolipides (PUFAs) servent aussi à la synthèse d'oxylipines dérivés d'acides gras libres ou pour la production d'arabidopsides (voir Partie Bibliographique) (Dubots et al., 2012).

L'invalidation du gène codant pour MGD1 (mutant *mgd1-2*), est létale. Le mutant *mgd1-2* ne croît qu'en présence de saccharose avec une diminution importante de la taille de la plante (Kobayashi et al., 2007). Le mutant *mgd1-2* présente une détérioration des membranes photosynthétiques conduisant à un dysfonctionnement de la photosynthèse et de la croissance autotrophe. Les plantes montrent un phénotype albinos. L'analyse du mutant *mgd1-2* montre donc que la présence du MGDG est essentielle pour la plante et qu'une compensation par l'expression de *MGD2* et de *MGD3* n'est possible que lorsque la plante est placée en carence de Pi. L'étude du rôle des MGDs par la génétique classique est donc rendue difficile de par le phénotype très sévère suite à la mutation de MGD1 et de par le fait que MGD2 et MGD3 soient apparemment dispensable (Kobayashi et al., 2007).

Avant mon arrivée au laboratoire, notre équipe a réalisé un criblage à haut débit d'une collection de petites molécules afin d'identifier des inhibiteurs de l'enzyme MGD1 d'*Arabidopsis*. A l'issue de ce criblage, la molécule inhibitrice combinant un effet (i) *in vitro* sur l'enzyme isolée, en système réactionnel solubilisé par un détergent ou en système membranaire intact, et (ii) *in planta*, sur la croissance de plantules d'*Arabidopsis*, a été appelée galvestine-1 (Botte et al., 2011). Cette nouvelle molécule agit au niveau moléculaire par compétition avec la liaison du DAG sur son site de fixation à la surface de l'enzyme. La galvestine-1 cible tous les membres de la famille des MGDG synthases (MGD1, MGD2 et MGD3), ce qui en fait un outil intéressant permettant d'étudier une condition qui n'a jamais pu être testée par des approches génétiques. La galvestine-1 est donc un outil de choix pour perturber le système des glycérolipides membranaires au niveau de la synthèse des

galactolipides et permettre son étude. La galvestine-1 est aussi un nouvel outil pour identifier et caractériser de nouveaux acteurs inconnus impliqués dans l'établissement et le contrôle de l'homéostasie lipidique.

La partie la plus importante de ma thèse a donc consisté à réaliser un crible d'une collection de mutants d'*Arabidopsis thaliana* générés par traitement en présence de méthanesulfonate d'éthyle afin d'identifier les plants résistants à la galvestine-1. L'étude de ces lignées a permis d'identifier des gènes candidats qui pourraient conférer une résistance à la galvestine-1. Dans ce chapitre de ma thèse, l'optimisation des conditions du criblage et la sélection de mutants EMS résistants à la galvestine-1 sont tout d'abord décrits. La caractérisation des lignées est ensuite détaillée et pour certaines lignées, les gènes candidats mutés conférant potentiellement la résistance à la galvestine-1 sont présentés. Enfin, une étude préliminaire des différentes lignées présentant un phénotype résistants à la galvestine-1 est décrite et les gènes candidats identifiés sont analysés dans ce contexte.

II. Optimisation du protocole de criblage de mutants EMS résistants à la galvestine-1

Afin de disposer d'un crible simple permettant de sélectionner facilement des mutants résistants à la galvestine-1, nous avons optimisé les conditions de culture d'*Arabidopsis* en présence de l'inhibiteur des MGDG synthases. Un critère important était l'économie de composé, synthétisé par Jean-Christophe Cintrat (IBITEC-Saclay). Un second critère était d'exercer une pression de sélection non létale. Un troisième critère était la simplicité et la reproductibilité du crible.

L'optimisation s'est basée sur les effets principalement visibles de la galvestine-1 (phénotype « sensible »), c'est-à-dire une forte réduction de la taille des plantules ainsi que de leurs racines, et le développement de feuilles chlorotiques (Botte et al., 2011). Un mutant présentant un phénotype « résistant » aura une taille similaire aux plantules cultivées en conditions standard, des racines bien développées et des feuilles vertes.

1. Choix du solvant optimal pour le crible

Pour optimiser les conditions de ce crible, j'ai tout d'abord choisi de tester différents solvants pour re-suspendre la galvestine-1, et permettre une diffusion de la molécule optimale dans la plante. Jusqu'ici, pour compléter un milieu de culture gélosé pour la croissance des plantes, la galvestine-1 était solubilisée complètement dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO), mais une étude a montré que le DMSO avait un effet inhibiteur sur les PLD et activateur sur les PLC, suivi d'une augmentation de la production d'AP (Clejan et al., 1996). Afin d'éviter des biais au niveau des phénotypes des mutants ou dans des analyses lipidiques par exemple, d'autres solvants ont été testés comme l'éthanol (EtOH), le Tween-20 (un excipient) et le Triton-X100 (un détergent), ces deux derniers étant classiquement utilisés pour perméabiliser les membranes. Ainsi des milieux de culture gélosés de plantes ont été complétés avec du DMSO à 1%, un mélange DMSO 1%/Tween-20 0,2% ; du Tween-20 à 0,2% ; un mélange EtOH 1%/Tween-20 0,2% et un mélange EtOH1%/Triton-X100 0,01% (Figure C1 1). Nous avons ensuite déterminé la concentration optimale de galvestine-1 qui sera utilisée pour le criblage. Pour cela, chaque milieu de culture contenant différents solvants ont été également complétés avec de la galvestine-1 à 0, 50, 100 et 250 μM (Figure C1 1). Des graines d'*Arabidopsis thaliana* ont été semées sur les différents milieux et ont été observées après 15 jours de culture. A la différence du phénotype observé en plaque multipuits (Botte et al., 2011), lorsque les plantes sont semées sur boîtes de pétri contenant le milieu complété avec du DMSO 1%, et de fortes concentrations de galvestine-1 (100 et 250 μM), les feuilles chlorotiques ne sont pas visibles. La taille des plantules est cependant fortement réduite. Dans ces conditions le phénotype sensible n'est pas assez visible pour un crible simple. Les plantules cultivées sur un milieu contenant un mélange de DMSO 1% et de Tween-20 0,2% présentent un phénotype sensible à 250 μM de galvestine-1: la taille des plantules est fortement réduite et les feuilles sont chlorotiques. Comme indiqué précédemment, la présence de DMSO pouvant introduire des biais dans l'analyse des mutants issus du criblage, cette solution n'est donc pas optimale. Il faut noter que la présence de Tween-20 accentue le phénotype sensible à 250 μM de galvestine-1 comparé au DMSO seul. Sur le milieu avec de l'EtOH 1%/Tween-20 0,2%, le phénotype sensible n'est pas observable aux différentes concentrations de galvestine-1 utilisées. Aucune graine n'a pu germer sur le milieu contenant de l'EtOH 1%/Triton-X100 0,01%. Ces solvants n'ont donc pas été retenus pour le criblage. Enfin, les plantules cultivées sur le milieu contenant du Tween à 0,2 % montrent une sensibilité à la galvestine-1 à partir de 100 μM . Le Tween-20 est donc le solvant

optimal pour le criblage, avec un effet de la galvestine-1 visible à faible concentration et un phénotype sensible plus clairement identifiable.

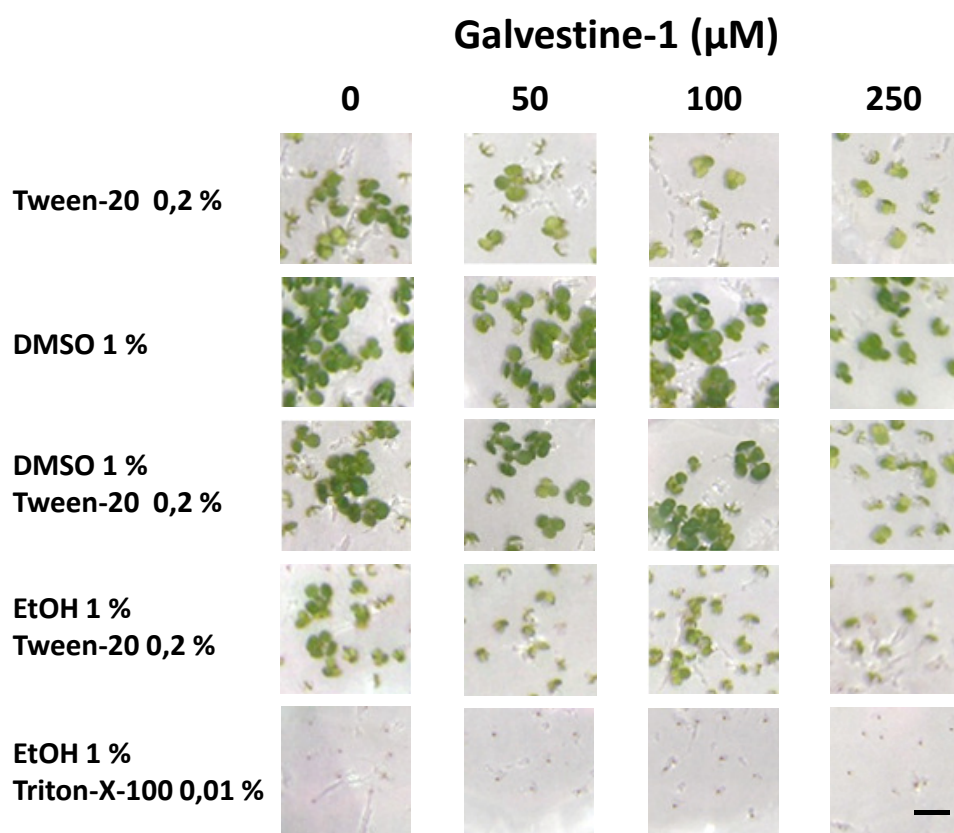


Figure C1 1 : Développement de plantules d'*Arabidopsis thaliana* cultivées en présence de galvestine-1, à différentes concentrations et dans différents solvants. Des graines d'*Arabidopsis thaliana* ont été stérilisées et ensemencées sur milieu Murashige et Skoog solide, dans des boîtes de pétri. Après stratification à 4°C pendant 2 jours à l'obscurité, les plants ont été transférés en chambre de culture (humidité 60%, 22°C : lumière blanche de densité de flux de photons de 70 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en cycle long (16 h lumière / 8 h obscurité) et observés sur une période de 15 jours. Les graines ont été semées sur milieu MS complété avec différentes concentrations de galvestine-1 (0, 50, 100 et 250 μM) diluée dans du Tween-20 0,2%, dans du DMSO 1%, dans un mélange DMSO 1%/ Tween-20 0,2%, dans un mélange EtOH 1%/Triton-X-100 0,01%, comme indiqué. Barre d'échelle : 0,5 cm.

2. Test de différentes conditions pour simplifier la sélection des plantes sensibles et résistantes

Une fois le solvant choisi, nous avons cherché à obtenir un crible facilement visible, en accentuant la différence entre un phénotype résistant et un phénotype sensible, c'est-à-dire augmentant le contraste de la couleur des feuilles qui soient plus « vertes » pour un phénotype résistant et plus « jaunes » pour le phénotype sensible. La croissance photo-autotrophique, qui utilise la lumière et le CO_2 comme source d'énergie et de carbone respectivement, nécessite la biogenèse des membranes thylacoïdiennes. Ce mécanisme est étroitement lié à la

différenciation de chloroplastes à partir de proplast embryonnaires. Lorsqu'une plante pousse à l'obscurité, des étioplastes, caractérisés par une absence de membranes photosynthétiques, se développent (Solymosi and Schoefs, 2010) et la croissance hétérotrophe utilise la matière organique déjà présente dans le milieu de culture, comme le saccharose par exemple. Dès que la plante capte de la lumière, des mécanismes se mettent en place pour induire la différenciation des étioplastes en chloroplastes (Solymosi and Schoefs, 2010). Des études ont montré que l'activité des MGDG synthases est diminuée lors de la croissance des plantes à l'obscurité (Ohta et al., 1995). L'illumination des plantules cultivées à l'obscurité pendant 4 jours conduit à une forte augmentation des teneurs en galactolipides.

En se fondant sur ces données, nous avons testé les effets d'une croissance à la lumière ou à l'obscurité, afin de déterminer si les phénotypes sensibles et résistants pouvaient être accentués. Des plantules ont donc été cultivées soit à la lumière pendant 15 jours, soit à l'obscurité pendant 3 jours puis mises à la lumière pendant 12 jours, jusqu'à observation. La croissance des plantules étant de type hétérotrophe à l'obscurité, les milieux de cultures ont été complétés avec différentes proportions de saccharose (0,5% et 2%) dans le but de déterminer la concentration optimale (Figure C1 2). A 15 jours de croissance, les plantules cultivées à l'obscurité durant 3 jours montrent une sensibilité à la galvestine-1 à partir de 100 μM , en présence de 0,5% ou de 2% de saccharose, avec des feuilles chlorotiques nettement plus visible comparées aux plantules cultivées uniquement à la lumière. De plus, la taille des plantules cultivées à l'obscurité est plus faible comparée à celles cultivées à la lumière. Une pré-culture à l'obscurité rend les effets de la galvestine-1 plus visible qu'une croissance à la lumière. Sur un milieu complété avec 2% de saccharose, les plantules cultivées à l'obscurité montrent un contraste plus élevé entre la condition contrôle sans galvestine-1 et en présence de 250 μM de composé comparé aux plantules sur milieu complété avec 0,5% de saccharose.

Nous avons ainsi déterminé les conditions optimales du crible qui sont de cultiver les plantules à l'obscurité pendant 3 jours sur un milieu complété avec 100 μM de galvestine-1 et 2% de saccharose, avant un transfert à la lumière. Sachant qu'à l'obscurité les MGDG synthases sont moins actives, les effets de la galvestine-1 sont limités. Le transfert à la lumière active la différenciation des chloroplastes et stimule l'activité des MGDG synthases. Ainsi après 15 jours de culture, nous émettons l'hypothèse que les plantules d'un mutant résistant développent des feuilles vertes, tandis qu'une plante sensible reste chlorotique et que sa croissance soit fortement ralentie.

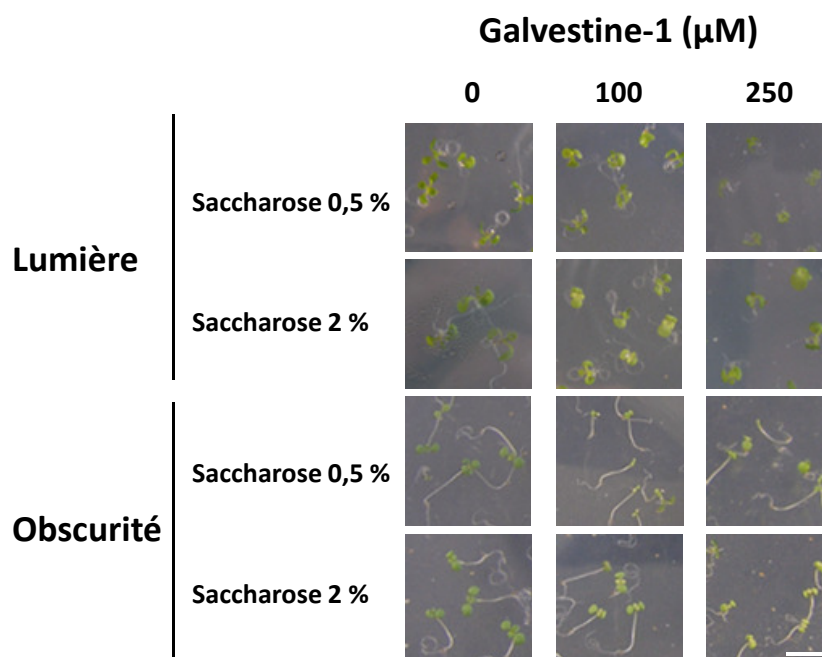


Figure C1 2 : Développement de plantules d'*Arabidopsis thaliana* cultivées en présence de galvestine-1 et de saccharose, à différentes concentrations, à la lumière et à l'obscurité. Des graines d'*Arabidopsis thaliana* (Col^{er105}) ont été stérilisées et ensemencées dans des boîtes de pétri contenant un milieu Murashige et Skoog gélosé. Après stratification à 4°C pendant 2 jours à l'obscurité, les plants ont été transférés en chambre de culture (humidité 60%, 22°C : lumière blanche de densité de flux de photons de 70 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) en cycle long (16 h lumière / 8 h obscurité) et observés sur une période de 12 jours. Les graines ont été semées sur milieu MS complété avec différentes concentrations de galvestine-1 (0, 100 et 250 μM) diluée dans du Tween-20 0,2% et complété avec différentes concentrations de saccharose (0,5% et 2%). Barre d'échelle : 0,5 cm.

3. Génération d'une collection de mutants d'*Arabidopsis* par traitement en présence de méthanesulfonate d'éthyle (EMS)

La dernière étape de préparation du crible a été de produire une collection de mutants aléatoires d'*Arabidopsis*, par traitement en présence de méthanesulfonate d'éthyle (EMS). Cette étape a été réalisée par Thierry Desnos (Laboratoire de Biologie du Développement des Plantes, iBEB, CEA Cadarache). La mutagenèse a été effectuée sur environ 80000 graines d'*Arabidopsis thaliana* de génération « M0 », dont le fond génétique est l'écotype *Columbia* contenant la mutation *erecta 105* (Col^{er105}). Cette mutation confère aux plantes un phénotype de petite taille, facilitant culture et croisements. Les graines de génération M0 ayant subi le traitement par l'EMS sont dites de génération M1 et ont été semées en terre pour produire des graines de génération M2 par autofécondation (Figure C1 3). Cent cinquante-six lots de

graines de génération M2 ont été récoltés à partir de 500 plantes de génération M1. C'est à partir de la génération M2 que le criblage décrit dans ce manuscrit a été réalisé.

4. Protocole du criblage

A partir de toutes les mises au point décrites dans les paragraphes précédents, nous avons obtenu un protocole optimal pour le criblage d'une collection de mutants EMS résistants à la galvestine-1. Les graines de génération M2 ont été semées sur un milieu complété avec de la galvestine-1 à 100 μ M et du saccharose à 2% (Figure C1 3). Les plantules ont ensuite été cultivées pendant 3 jours à l'obscurité avant d'être transférées à la lumière et d'être observées après 15 jours de culture. Les plants présentant un phénotype résistants sont verts avec une taille similaire à celle d'une plantule contrôle (Col^{er105}), tandis que les plants ayant un phénotype sensible sont chlorotiques et de taille réduite (Figure C1 4). Les plants potentiellement résistants ont alors été sélectionnés et transférés sur un milieu complété avec une concentration plus élevée en galvestine-1 (250 μ M). Cette étape permet de confirmer la résistance à la galvestine-1 et d'éliminer les faux positifs. A 22 jours, les plantules ayant conservé le phénotype résistant ont été transférées en terre pour produire des graines de génération M3. Ces lignées sont donc considérés comme résistants à la galvestine-1 et ont été nommés « gali » (**gal**vestine-1 **ins**ensitive).

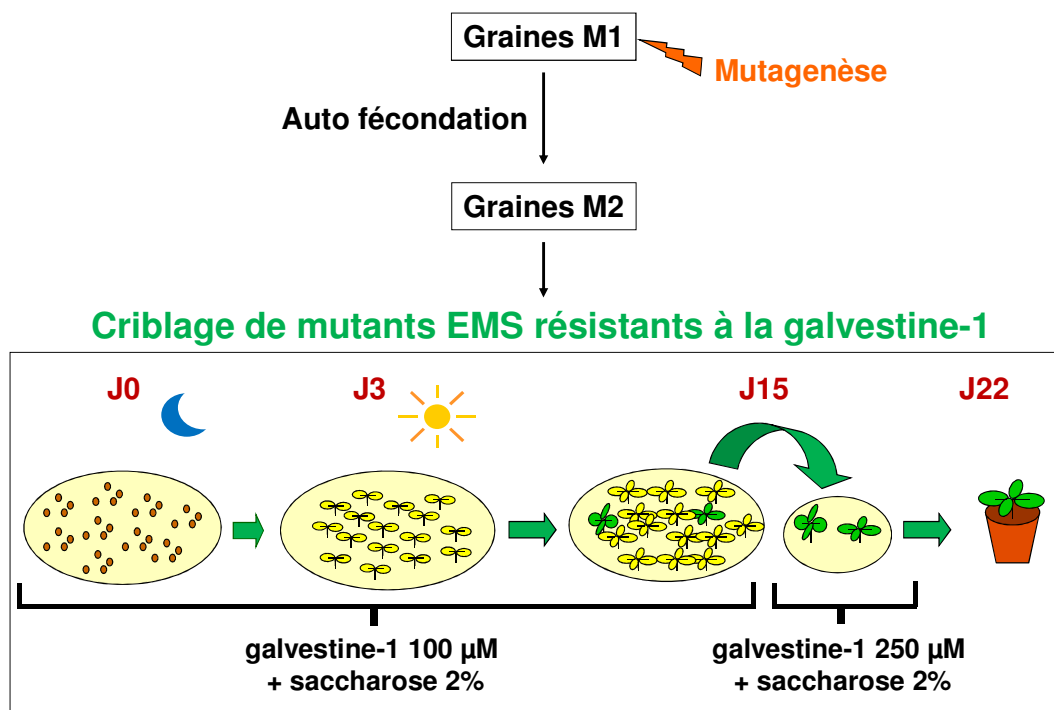


Figure C1 3 Protocole du criblage d'une collection de mutants *Arabidopsis thaliana* générés par traitement en présence de méthanesulfonate d'éthyle, visant à identifier des lignées résistantes à la galvestine-1. Des graines d'*Arabidopsis thaliana* (Col^{er105}) de génération M1 ont été mutées au méthanesulfonate d'éthyle (EMS). Après autofécondation d'environ 500 plantes M1, des graines de génération M2 ont été produites et réparties en 156 lots. Cinquante lots de graines ont été utilisés pour le criblage. Deux mille graines de chaque lot ont été stérilisées et ensemencées sur milieu Murashige et Skoog gélosé complété avec du saccharose 2% et avec de la galvestine-1 à 100 µM, diluée dans du Tween-20 0,2%. Après stratification à 4°C pendant 2 jours à l'obscurité, les plants ont été conservés à l'obscurité durant 3 jours (J3), permettant une croissance hétérotrophe limitant les effets de la galvestine-1. Puis les plants ont été transférés en chambre de culture (humidité 60%, 22°C : lumière blanche de densité de flux de photons de 70 µE.m⁻².s⁻¹) en cycle long (16 h lumière / 8 h obscurité). Après 15 jours (J15), une plantule potentiellement résistante à la galvestine-1 est reconnaissable par des feuilles vertes, par contraste avec les plantules sensibles qui présentent des feuilles chlorotiques. Les plantules considérées comme potentiellement résistantes à la galvestine-1 sont transférées sur un milieu Murashige et Skoog gélosé complété avec du saccharose 2% et avec de la galvestine-1 à 250 µM, diluée dans du Tween-20 0,2%. Les plantules sont cultivées en chambre de culture (humidité 60%, 22°C : lumière blanche de densité de flux de photons de 70 µE.m⁻².s⁻¹) en cycle long (16 h lumière / 8 h obscurité) puis sont observés à 22 jours (J22). Lorsque qu'une plantule a développé des feuilles vertes, la résistance à la galvestine-1 est confirmée. Dans le cas contraire, la plantule présente des feuilles chlorotiques et s'avère donc sensible. Les plantes résistantes à la galvestine-1 sont finalement transférées en terre.

III. Sélection de lignées mutantes résistantes à la galvestine-1

1. Criblage primaire

Cinquante lots de 2000 graines de génération M2 ont été criblés, ce qui correspond à environ 100000 graines mutées aléatoirement. Nous considérons que dans ces conditions le

génom est couvert approximativement 6 fois, c'est-à-dire que chaque gène est muté en moyenne 6 fois. Sachant que le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient 25000 gènes, cette collection correspond donc à 150000 mutations aléatoires. Trente-cinq plantes présentant le phénotype résistant (Figure C1 4) ont été sélectionnées à partir de ce criblage.



Figure C1 4 : Plantule d'*Arabidopsis thaliana* mutée par traitement à l'EMS potentiellement résistante à la galvestine-1. Des graines d'*Arabidopsis thaliana*, de génération M2 et mutées par traitement au méthanesulfonate d'éthyle (EMS) ont été stérilisées et semencées sur milieu Murashige et Skoog gélosé complété avec du saccharose 2% et avec de la galvestine-1 à 100 μM , diluée dans du Tween-20 0,2%. Après stratification à 4°C pendant 2 jours dans l'obscurité, les plants ont été conservés à l'obscurité durant 3 jours, permettant une croissance hétérotrophe limitant les effets de la galvestine-1. Puis les plants ont été transférés en chambre de culture (humidité 60%, 22°C : lumière blanche de densité de flux de photons de 70 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en cycle long (16 h lumière / 8 h obscurité). Les plantules ont ensuite été observées après 12 jours de culture. Une plantule potentiellement résistante à la galvestine-1 (cerclée de rouge) est reconnaissable par des feuilles vertes, par contraste avec les plantules sensibles (plantules non cercleées) qui présentent des feuilles chlorotiques.

2. Confirmation de la résistance à la galvestine-1

A l'issue du criblage, les mutants potentiellement résistants sont sélectionnés et transférés sur un milieu complété avec une concentration plus élevée en galvestine-1 (250 μM). Cette étape permet de confirmer la résistance et d'éliminer les faux positifs. En effet, les plantules peuvent croître de manière regroupée. Les plantules à la périphérie peuvent absorber la galvestine-1 permettant à celles situées en position plus centrale de se développer sur un milieu localement dénué de galvestine-1, suivant un phénomène de protection. Le crible secondaire est réalisé à une concentration en inhibiteur plus élevée et à une densité de plantules plus faible par rapport au criblage primaire. Une lignée résistante conserve des feuilles vertes durant les 7 jours qui suivent le transfert, est nommé « gali » (**gal**vestine-1 insensitive) (Figure C1 5), et est transféré en terre.

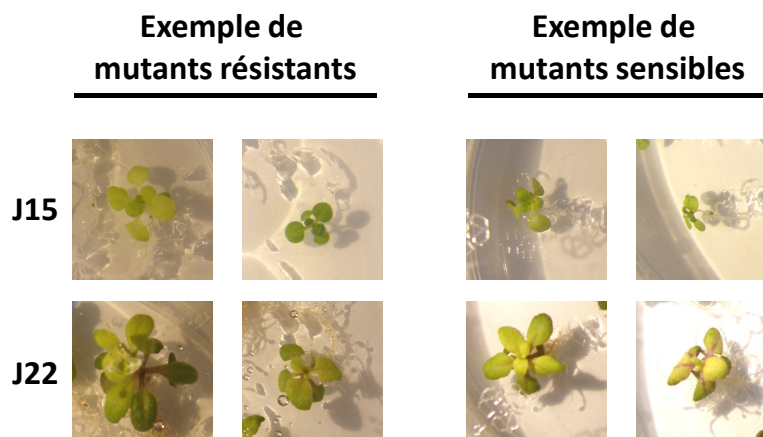


Figure C1 5 : Test de la confirmation de la résistance à la galvestine-1 de plantules d'*Arabidopsis thaliana* issues du criblage de mutants EMS. Au 15^{ème} jour (J15) du criblage, des plantules d'*Arabidopsis thaliana* considérées comme résistantes sont sélectionnées et transférées sur un milieu Murashige et Skoog gélosé complété avec du saccharose 2% et avec de la galvestine-1 à 250 μM diluée dans du Tween-20 0,2%. Les plantules sont cultivées en chambre de culture (humidité 60%, 22°C : lumière blanche de densité de flux de photons de 70 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en cycle long (16 h lumière / 8 h obscurité) puis sont observés à 22 jours (J22), soit 7 jours après le transfert sur le nouveau milieu. Lorsque la résistance à la galvestine-1 est confirmée, la plantule développe des feuilles vertes (gauche de la figure). Dans le cas d'un faux positif, la plantule développe des feuilles chlorotiques et s'avère donc sensible à la galvestine-1 (droite de la figure).

Le test de confirmation de la résistance à la galvestine-1 de plantules d'*Arabidopsis thaliana* issues du criblage de mutants EMS a permis d'isoler 15 mutants gali. De nombreux faux positifs ont pu être éliminés grâce à ce crible secondaire (non quantifiés). Les lignées gali ainsi sélectionnées sont gali1, gali2, gali6, gali7, gali8, gali9, gali12, gali21, gali22, gali25, gali27, gali28, gali31, gali32 et gali34 (Tableau C1 1).

Il a été important de déterminer si le phénotype de résistance à la galvestine-1 au sein de chaque lignée gali se conservait d'une génération à l'autre, afin d'orienter la stratégie de l'étude des différentes lignées.

Vu le nombre d'événements mutagènes par lignée traitée en présence d'EMS, il est en possible que le phénotype soit lié à plusieurs mutations, avec une perte de ce phénotype aux générations suivantes (voir plus loin). Chaque lignée gali transférée en terre ayant produit une génération de graines M3 par autofécondation a donc été semée sur galvestine-1 à 100 μM , selon les conditions du crible (voir II.4). Toutes les lignées gali testées présentaient des plantes de génération M3 avec un phénotype résistant, indiquant que les mutations *liées* à la résistance de la galvestine-1 étaient transmises (Figure C1 5).

Lignée gali	Confirmation de la résistance à la galvestine-1	Mutation dominante ou récessive	Backcross 1	Backcross 2	Backcross 3	Croisement pour la cartographie
gali1	X	Dominante	X	X	X	X
gali2	X	Dominante	X	X	X	
gali6	X	Dominante	X			X
gali7	X	Dominante	X	X		
gali8	X	?	X	X		
gali9	X	Dominante	X	X		
gali12	X	?	X			
gali21	X	Dominante	X			
gali22	X	Dominante	X			X
gali25	X	?	X			X
gali27	X	Dominante	X			X
gali28	X	Dominante	X	X		
gali31	X	Dominante	X			
gali32	X	Dominante	X			X
gali34	X	Dominante	X	X		X

Tableau C1 1 : Tableau récapitulatif indiquant le type de mutation, l'avancée de la purification et l'avancée de la cartographie pour chaque lignée gali étudiée.

IV. Identification du type de mutation des différentes lignées sélectionnées

1. Purification des lignées gali par croisements

Lorsque la mutagenèse a été réalisée, les conditions étaient saturantes afin de pouvoir couvrir le génome, c'est-à-dire obtenir au moins une mutation par gène. Cette stratégie conduit à introduire plusieurs mutations au sein de chaque graine. Par conséquent, les lignées gali peuvent contenir non seulement la mutation qui confère la résistance à la galvestine-1, mais aussi plusieurs autres mutations dites "parasites". Le phénotype des lignées gali peut

donc être modifié par ces mutations parasites et il est donc difficile de les étudier à ce stade. La purification de chaque lignée gali s'effectue par des séries de rétro croisements (ou « backcross »), avec une plante contrôle de même fond génétique (Col^{er105}), et par la ségrégation de la mutation conférant le phénotype résistant. Trois séries de backcross doivent être réalisés pour obtenir une ségrégation optimale et considérer la lignée comme « pure », avec en théorie uniquement la mutation de résistance à la galvestine-1 par lignée gali. A partir de ce stade, la caractérisation de la lignée est possible sur des plantes homozygotes.

2. Identification du type de mutation

Les mutations contenues dans les lignées gali peuvent être dominantes ou récessives. Connaître le type de mutation permet d'établir la stratégie de cartographie. En effectuant les rétro-croisements entre lignées gali et Col^{er105}, nous avons pu obtenir ces informations pour la plupart des lignées. Chaque plante de la génération F1 issue de ce croisement a produit par autofécondation une génération F2, testée sur galvestine-1 à 100 µM dans les conditions du crible (voir II.4). Un test de ségrégation est effectué où la proportion de plantes présentant un phénotype résistant est calculée. Sachant que cette population F2 contient ¼ de plantes sauvage Col^{er105}, ½ de mutants hétérozygotes et ¼ de mutants homozygotes, si la population F2 présente 75% de plantes avec un phénotype résistant contre 25% de plantes sensibles, la mutation est de type dominant puisque un allèle muté suffit à conférer le phénotype résistant. Dans ce cas, le phénotype est qualifié de dominant. Par contraste, si la population F2 présente 25% de plantes avec un phénotype résistant contre 75% de plantes sensibles, la mutation est de type récessif puisque l'obtention d'un phénotype résistant nécessite d'avoir deux allèles mutés.

Chaque lignée gali a été rétro-croisé avec une plante contrôle pour fournir une population F1 (Tableau C1 1). Après culture en terre de chaque F1 provenant des différentes lignées gali, les différentes populations F2 ont été testées sur galvestine-1 à 100 µM dans les conditions du crible (voir II.4). Les résultats obtenus pour l'ensemble des tests de ségrégation montrent que les mutations des lignées gali1, gali2, gali6, gali7, gali9, gali21, gali22, gali27, gali28, gali31, gali32 et gali34 sont dominantes, avec 75% de plantes présentant un phénotype résistant et 25% de plantes présentant un phénotype sensible (Tableau C1 1). Après les trois rétro-croisements pour chaque lignée, la génération F2 est testée de la même façon sur galvestine-1 à 100 µM suivant les conditions du crible (voir II.4). Etant donné que la mutation

est de type dominant pour ces lignées gali, il n'est pas possible de discriminer une plante de génération F_n résistante hétérozygote d'une résistante homozygote. Il faut donc obtenir une génération F_{n+1} et la tester sur galvestine-1 afin d'évaluer si la population est composée de 100% de mutants résistants, pour un mutant homozygote. Les lignées gali8, gali12 et gali25 présentent des résultats avec des proportions de mutants résistants et de mutants sensibles ne respectant pas les lois de Mendel. Ce phénomène est possiblement dû à des problèmes de pénétrance des mutations, c'est-à-dire que le phénotype résistant ne peut pas s'exprimer, bien que la plante contienne la mutation de la résistance à la galvestine-1. Les mutations parasites peuvent interférer avec le phénotype de résistance et être à l'origine de ce problème de pénétrance. Des backcross supplémentaires sont nécessaires pour effectuer à nouveau un test de ségrégation et déterminer le type de mutation.

A partir de ces résultats et des différents phénotypes exprimés par certaines lignées gali, j'ai choisi de me focaliser sur les lignées gali1, gali2, gali7 et gali34 afin de les caractériser. La cartographie a été engagée pour les lignées gali1 et gali34 (Tableau C1 1).

V. Caractérisation de la lignée gali1

1. Information sur le type de mutation de gali1

La lignée gali1, isolée à partir du criblage, a fourni une génération de graines M3 qui a été testée sur galvestine-1 en condition du criblage. Les résultats ont montrés que gali1 présentait un phénotype résistant conservé dans la génération suivante. (Figure C1 6, Tableau C1 1). Trois backcross ont pu être réalisés sur la lignée gali1 et la génération F2 a été obtenue au terme des trois années de thèse. La caractérisation pourra être effectuée à partir de plantes gali1 homozygotes de génération F3 puisque la mutation est dominante.

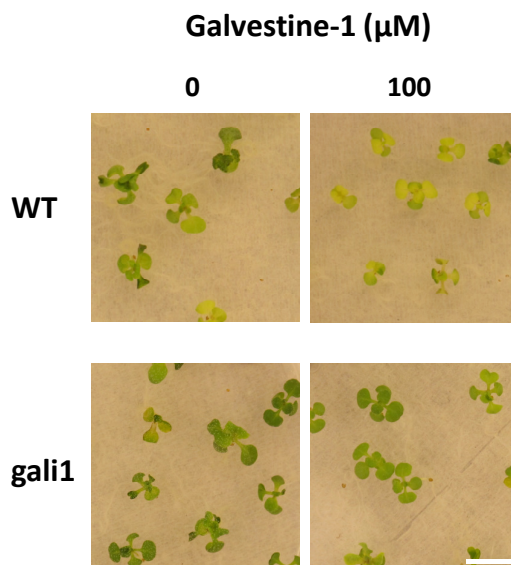


Figure C1 6 : Test de résistance à la galvestine-1 de la lignée gali1. Des graines de la lignée gali1 ont été stérilisées et ensemencées sur milieu Murashige et Skoog gélosé complété avec du saccharose 2% et avec de la galvestine-1 à 100 μM diluée dans du Tween-20 0,2%. Après stratification à 4°C pendant 2 jours à l'obscurité, les plants ont été transférés en chambre de culture, conservées à l'obscurité durant 3 jours, puis placées à la lumière en cycle de jours longs pour être observées sur une période de 15 jours. Sur 100 μM de galvestine-1, les plantules WT présentaient un phénotype sensible avec des feuilles chlorotiques et une taille réduite comparées aux plantules contrôles (0 μM). Les plantules de la lignée gali1 présentaient un phénotype résistant avec une taille des plantules similaire à celle des plantules sur le milieu contrôle et des feuilles vertes. Barre d'échelle : 1 cm.

2. Phénotype de la lignée gali1

Une caractérisation phénotypique préliminaire a été effectuée sur la lignée gali1 à partir de plantes homozygotes issues de la F3 d'un 2^{ème} backcross (gali1 BC2F3). Les plantules gali1 cultivée en terre sont similaires au WT (Figure C1 7). Cependant, une floraison précoce de quelques semaines est observée chez la lignée gali1 (non quantifié).

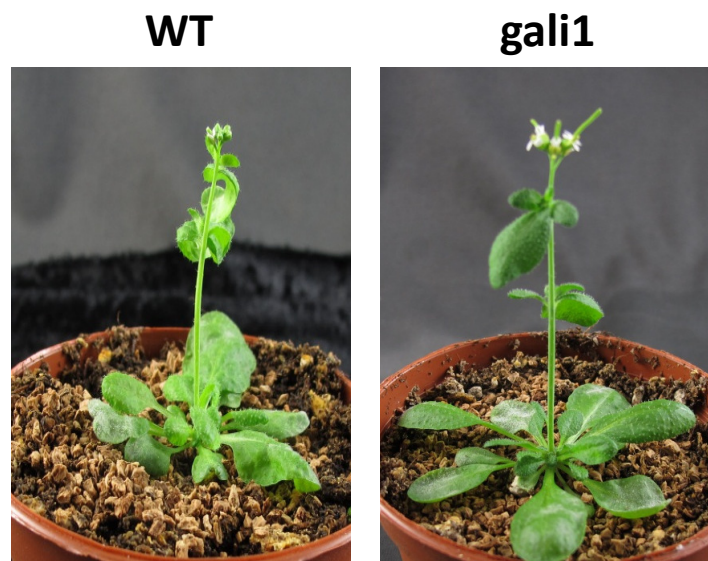


Figure C1 7 : Plantule gali1 cultivée en terre après avoir été sélectionné sur galvestine-1 suivant les conditions du crible. La plantule gali1 (à droite) est pratiquement similaire au WT (à gauche). Une floraison précoce est observable chez la plantule gali1.

Des plantules gali1 et WT ont été cultivées suivant les conditions du criblage pendant 15 jours. Les plantules WT et les plantules gali1 présentant un phénotype résistant ont été ensuite transférées en terre. Des échantillons de feuille de plantules gali1 et WT ont été observées à 25 jours en microscopie confocale. Les chloroplastes ont été visualisés par autofluorescence de la chlorophylle (Figure C1 8). Les chloroplastes de la plantule gali1 ne présentent pas de différences visibles comparés au WT lorsque les plantes ne sont pas exposées à l'inhibiteur. Cette observation préliminaire des chloroplastes sera effectuée plus finement à partir de plantules homozygotes provenant de la lignée gali1 purifiée. L'observation sera bien entendu réalisée en présence de galvestine-1, afin d'évaluer si le phénotype de résistance est corrélé au développement du chloroplaste

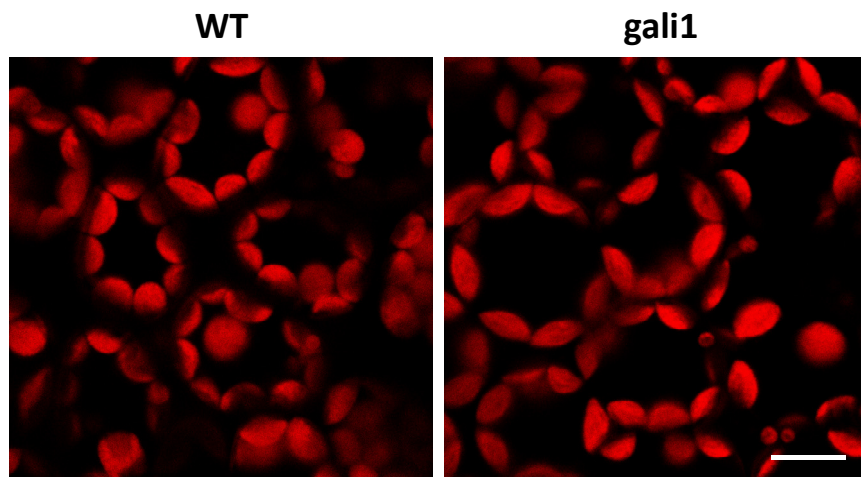


Figure C1 8 : Observation des chloroplastes à partir de feuilles de plantules *gali1* et WT, en présence de galvestine-1. Des plantules *gali1* et des plantules contrôles Col^{er105} (WT) ont été cultivées 3 jours à l'obscurité puis 12 jours à la lumière, sur un milieu gélosé complété avec de la galvestine-1 à 100 μ M et 2% de saccharose. A 15 jours, les plantules WT et les plantules *gali1* présentant un phénotype résistant ont été ensuite transférées en terre. Un échantillon de feuille de plantule *gali1* et WT ont été observées à 25 jours en microscopie confocale. Les chloroplastes ont été visualisés par autofluorescence de la chlorophylle. Les chloroplastes de la plantule *gali1* ne présentent pas de différences phénotypiques comparés au WT. Barre d'échelle : 10 μ m.

3. Caractérisation du profil lipidique de la lignée *gali1*

Une analyse glycérolipidique a été réalisée sur des plantules *gali1* BC2F3 homozygotes (Figure C1 9). L'analyse du profil des acides gras totaux de plantules *gali1* et de plante contrôle Col^{er105} (WT) cultivées en conditions standard ne montre pas de différence significative de composition en acides gras (Figure C1 9, A). Par contraste, en présence de galvestine-1, le profil en acides gras montre une diminution significative du C18:1 et du C18:2 dans la lignée *gali1* comparé au WT (Figure C1 9, A).

Les plantules *gali1* BC2F3 présentent un niveau basal de MGDG significativement plus élevé comparé au WT en présence de galvestine-1 (Figure C1 9, B). La mutation conférant une résistance à la galvestine-1 implique donc une production de MGDG plus importante que chez le sauvage en présence de l'inhibiteur. Si on examine la réponse en fonction de la dose, le niveau global de MGDG diminue toutefois en présence de galvestine-1, ce qui indique une sensibilité chez *gali1*. En présence de galvestine-1 le niveau de MGDG de *gali1* est proche de celui du WT en condition contrôle, ce qui est cohérent avec un développement non altéré des membranes chloroplastiques, le développement de feuilles vertes, une photosynthèse apparemment non altérée et une croissance comparable à celle d'une plante WT sur un milieu standard. Le profil en acyls du MGDG ne présente aucune

différence entre les plantules *gali1* et WT avec une augmentation significative du C16:3 et une diminution significative du C18:3 en présence de galvestine-1 (Figure C1 9, C).

En absence de galvestine-1, la teneur en DGDG de *gali1* est semblable à celle du WT (Figure C1 9, B). En présence de galvestine-1, une diminution significative du niveau de DGDG est observée dans le WT par rapport à la condition contrôle, tandis que le niveau de DGDG n'est pas modifié dans la lignée *gali1*. De plus, le niveau de DGDG est significativement plus élevé dans la lignée *gali1* comparé au WT en présence de galvestine-1. Ce phénomène peut être expliqué par l'augmentation du niveau de MGDG en présence de galvestine-1 qui maintiendrait une production de DGDG. Le profil en acyls du DGDG ne présente pas de différence majeure entre les plantules *gali1* et WT (Figure C1 9, D).

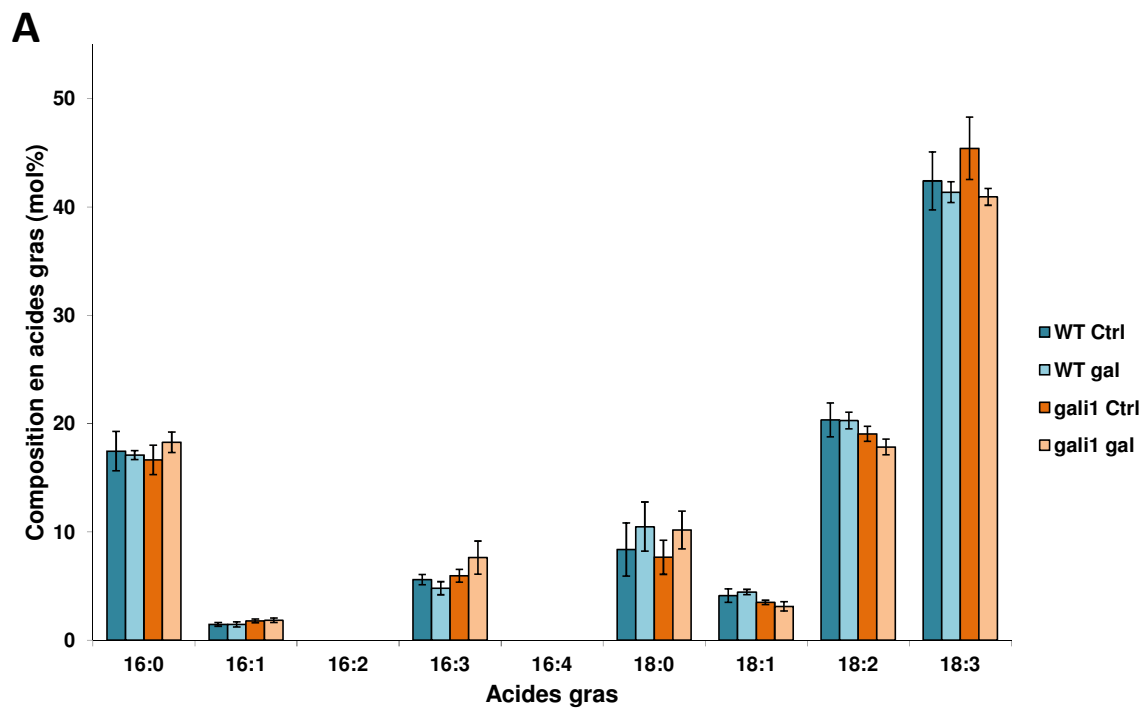
En condition standard et en présence de galvestine-1, le niveau de PG dans la lignée *gali1* est supérieur à celui du WT (Figure C1 9, B). En présence de galvestine-1, le niveau de PG augmente légèrement dans la lignée *gali1* tandis qu'il reste stable dans le WT. La mutation conférant la résistance à la galvestine-1 provoque donc aussi une augmentation de la production de PG dans la lignée *gali1*. L'analyse du profil en acyls montre que le niveau de C18:2 du PG est moins élevée dans les plantules *gali1* comparé aux plantules WT en condition standard et en présence de galvestine-1. Il est intéressant de noter que le PG a un niveau basal de C16:1 significativement plus élevé dans la lignée *gali1* (Figure C1 9, E). En présence de galvestine-1, dans la lignée *gali1*, le niveau de PG reste proche de celui de la condition contrôle, tandis qu'une augmentation de C16:1 est observée dans le WT. Chez les plantes, le PG thylacoïdien est caractérisé par la présence de C16:1(3*t*), localisé exclusivement en position *sn*-2 (Wada and Murata, 2007), suggérant que la mutation pourrait avoir un impact sur les teneurs d'autres lipides chloroplastiques que les galactolipides. Le PG étant produit en utilisant des précurseurs de la voie procaryote, il est envisageable que la mutation responsable de la résistance à l'inhibiteur des MGDG synthases touche cette voie.

Pour finir, le niveau basal des phospholipides PE et PC est significativement moins élevé dans la lignée *gali1* comparé au WT en condition contrôle ou en présence de galvestine-1, indiquant que l'équilibre galactolipide/phospholipide est modifié dans la lignée *gali1*.

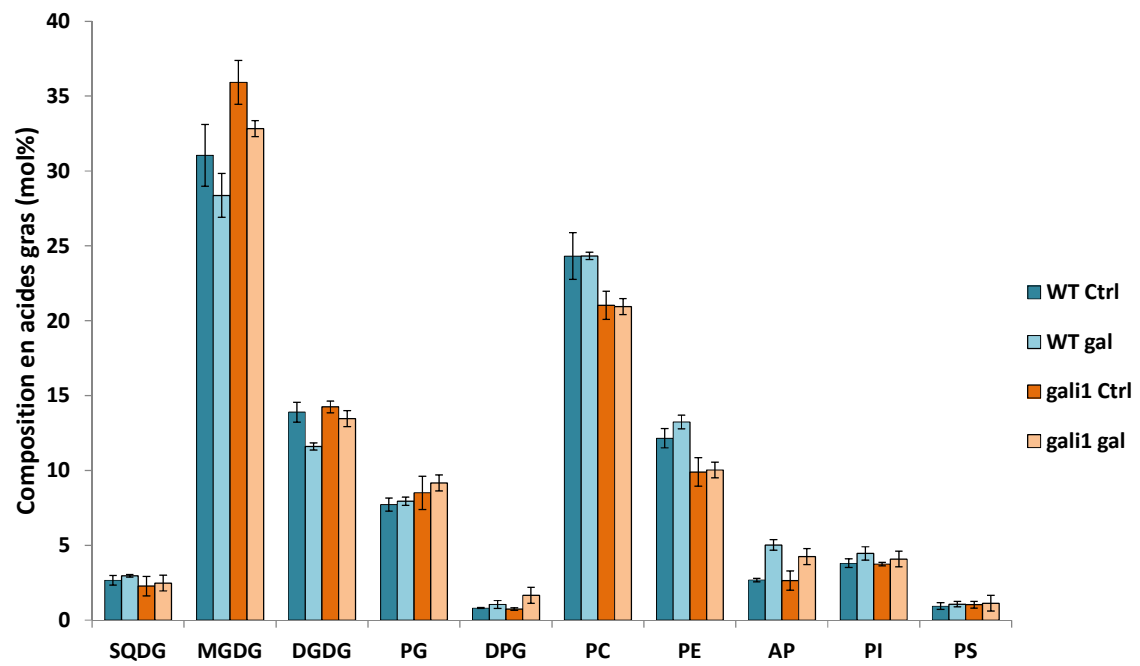
Tous ces résultats indiquent que la mutation de *gali1* pourrait provoquer une stimulation de la synthèse des glycérolipides de la voie procaryote, d'où une augmentation de la synthèse de lipides chloroplastiques (MGDG, DGDG, PG) et une diminution apparente de la proportion de phospholipides PE et PC que nous observons. En présence de galvestine-1,

Chapitre 1

les effets ont moins d'impact sur le système des glycérolipides membranaires dans la lignée *gali1*, puisque le niveau de DGDG reste stable probablement suite à l'augmentation de la production de MGDG. L'ensemble de ces résultats est cohérent avec une biogénèse chloroplastique non affectée par le traitement en présence de galvestine-1 et une photosynthèse non altérée permettant aux plantules *gali1* d'avoir une croissance identique à celle obtenue dans la condition contrôle.

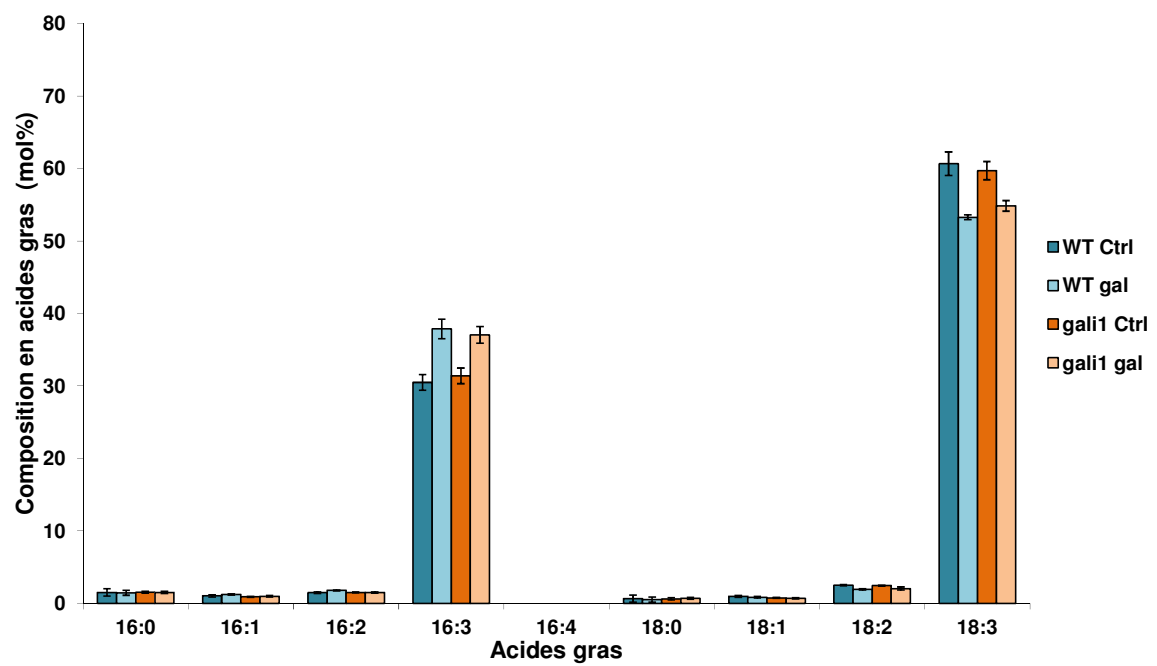


B

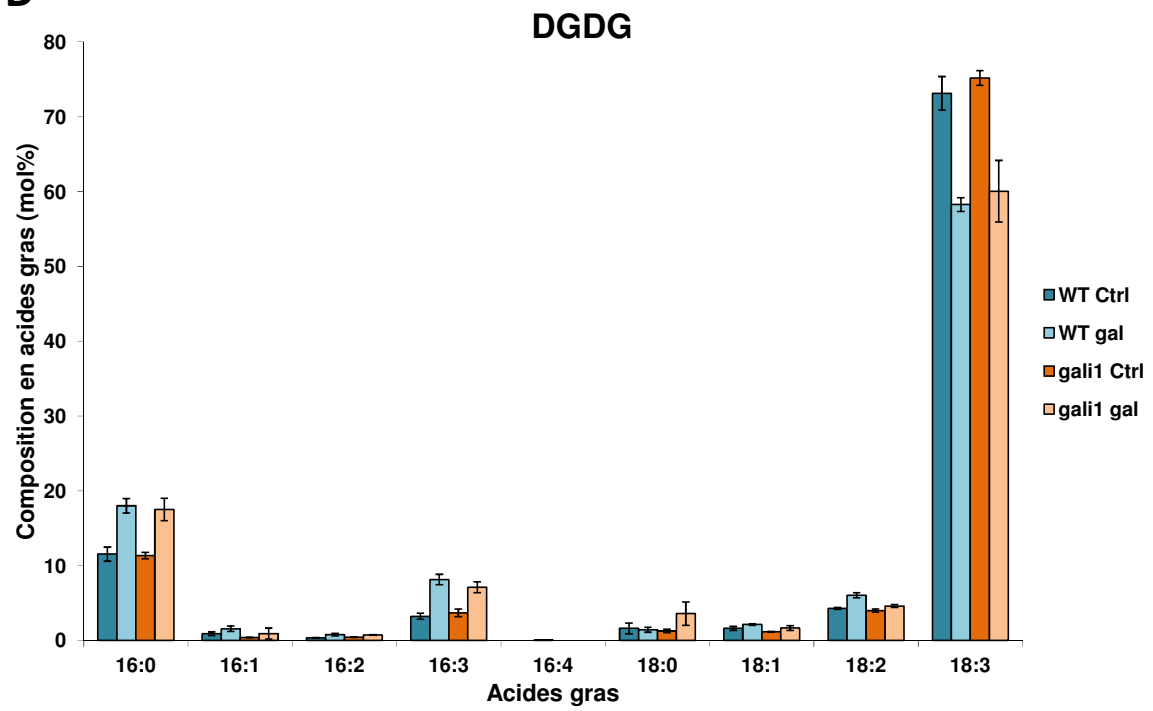


C

MGDG



D



E

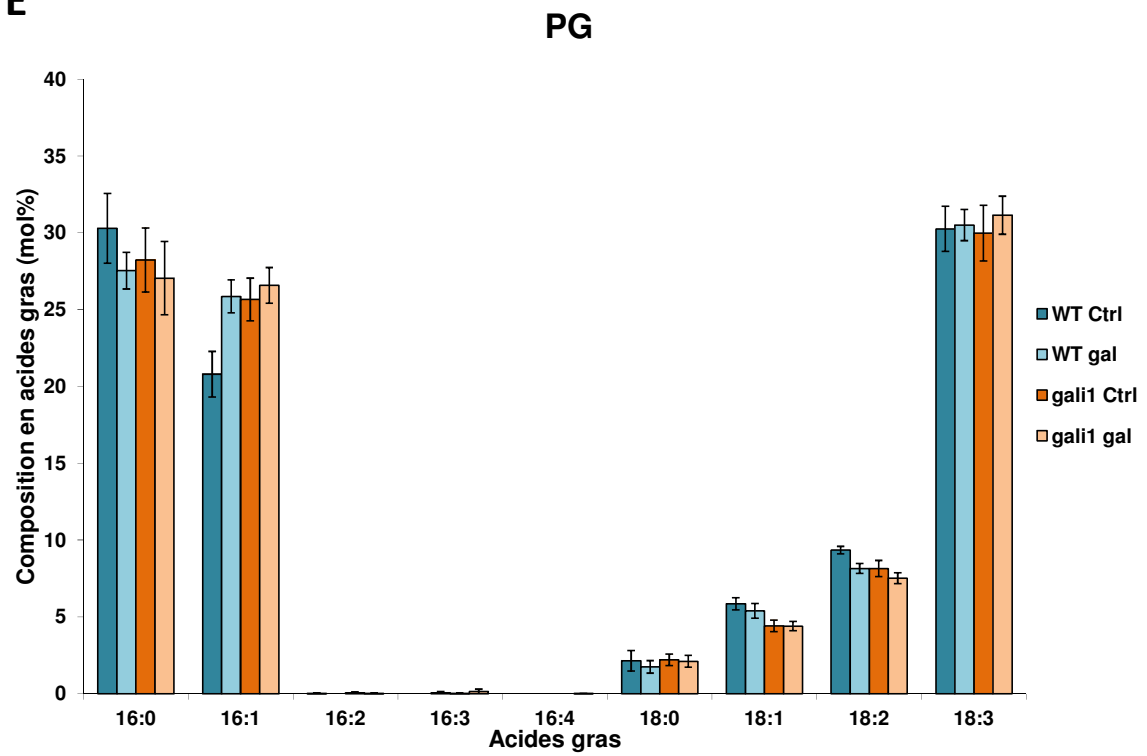


Figure C1 9 : Profil lipidique de rosettes gali1 traitées en présence de galvestine-1. Des plantules homozygotes gali1 issues de la F3 (2 backcross ; gali1 BC2F3) et des plantules contrôles Col^{er105} (WT) ont été cultivées sur un milieu Murashige et Skoog gélosé complété avec du saccharose 2% et avec de la galvestine-1 à 100 µM diluée dans du Tween-20 0,2% (galv), ou sur un milieu contrôle de même composition sans galvestine-1 (Ctrl), dans les conditions du crible. Après 15 jours de croissance, les plantules ont été récoltées et congelées dans de l'azote liquide pour réaliser une extraction lipidique. Les lipides ont été extraits et séparés par chromatographie sur couche mince en 2 dimensions. **A) Analyse des acides gras totaux.** Chaque acide gras a été quantifié par chromatographie gazeuse. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs de 3 expériences indépendantes et la composition en lipide est exprimée en fonction du pourcentage de lipides totaux. **B) Analyse des classes lipidiques.** Chaque classe de glycérolipides a été quantifiée par chromatographie gazeuse. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs de 3 expériences indépendantes et la composition en lipide est exprimée en fonction du pourcentage de lipides totaux. **C) Profil en acyls du MGDG. D) Profil en acyls du DGDG. E) Profil en acyls du PG.** Les profils ont été déterminés à partir de plantules homozygotes du lignée gali1 BC2F2 et de plantules contrôles (Col^{er105}). La composition en acides gras a été déterminée après méthanolyse et analyse des méthyl esters d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse et détection à ionisation de flamme. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs de 3 expériences indépendantes et la composition en lipide est exprimée en fonction du pourcentage de lipides totaux. Les barres d'erreur représentent la SEM (standard error of the mean) sur les 3 expériences indépendantes. DGDG, digalactosyldiacylglycérol ; MGDG, monogalactosyldiacylglycérol ; PG, phosphatidylglycérol.

4. Séquençage des gènes de MGDG synthases

Une hypothèse possible de la résistance à la galvestine-1 est qu'une mutation au niveau des gènes codant pour les MGDG synthases pourrait modifier leurs activités ou l'interaction avec la galvestine-1, ce qui maintiendrait une production de MGDG similaire à celle d'une plante WT ou impliquerait une surproduction de MGDG dans la lignée gali1. Un séquençage des gènes *MGD1*, *MGD2* et *MGD3* a été réalisé dans la lignée gali1 suivant le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes. Les résultats ne présentent aucune mutation dans les 3 gènes codant pour les MGDG synthases.

5. Localisation de la mutation dans le génome de gali1

En parallèle de la caractérisation phénotypique et de la purification de la lignée gali1, la localisation de la mutation conférant la résistance à la galvestine-1 a été réalisée par séquençage profond du génome de la lignée gali1. Ce type de séquençage, appelé NGS (next generation sequencing) est un séquençage par synthèse chimique précis et robuste qui permet de localiser une mutation ponctuelle dans un génome. Ce travail a été effectué en collaboration avec Emeline Lhuillier (Plateforme Génomique de Toulouse, GeT-PlaGe). L'analyse bio-informatique à partir des données obtenues par le NGS a été réalisée par Benjamin Peret et Thierry Desnos (Laboratoire de Biologie du Développement des Plantes, iBEB, CEA Cadarache) afin d'identifier le(s) gène(s) muté(s).

a) Analyse bio-informatique des résultats du séquençage NGS de la lignée gali1

Le séquençage par synthèse de la lignée gali1 a généré 54.279.278 lectures ou « reads » et la taille moyenne des inserts est de 440 bp (Figure C1 10). Du fait du caractère mendélien des mutations étudiées, les chromosomes mitochondriaux et chloroplastiques n'ont pas été retenus pour la cartographie des reads afin d'accélérer l'analyse. Les fichiers de cartographie ont ensuite été assemblés grâce à la fonction « mapmerge » de MAQ et les statistiques d'alignement sont données dans le Tableau C1 2. La profondeur de séquençage, c'est-à-dire le nombre de fois que le génome a été couvert, de la lignée gali1 est de 35,4. Le fait que la quantité de données et que la profondeur de séquençage soient très importantes indiquent que la cartographie est très précise.

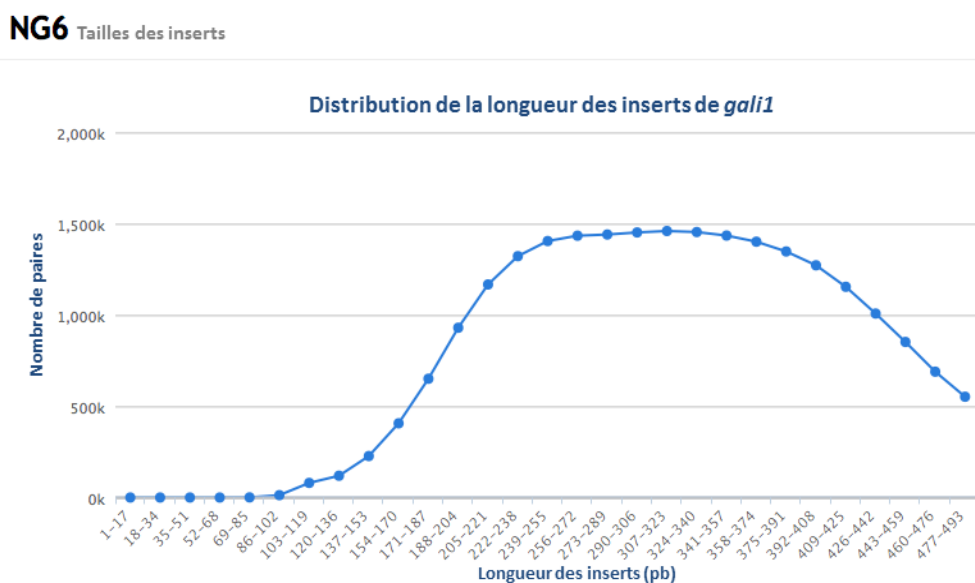


Figure C1 10 : Graphique de la répartition des tailles des inserts de la lignée gali1.

Le croisement d'une plante gali1 (écotype *Col-0*) avec une plante d'un écotype différent (*Landsberg erecta*) a introduit une grande quantité de SNPs dans la population séquencée (population de mapping). La sélection de plantes homozygotes pour la mutation étudiée introduit donc un biais dans la répartition des SNPs, une propriété utilisée pour cette méthode de cartographie. En effet, la probabilité d'obtenir un SNP dans la population séquencée est de 50% alors qu'à proximité de la mutation cette probabilité tend vers 0.

Chapitre 1

Nombre de lectures 1	27 139 639
Nombre de lectures 2	27 139 639
Paired	54 279 278
Taille des Lectures (pb)	100
Nombre de lectures cartographiées (TAIR10 tous les chromosomes)	50 888 075
Pourcentage de lectures cartographiées (TAIR10 tous les chromosomes)	93,75
Nombre de lectures cartographiées (TAIR9 tous les chromosomes)	42 235 458
Pourcentage de lectures cartographiées (TAIR9 tous les chromosomes)	77,81
Profondeur moyenne de séquençage	35,4

Tableau C1 2 : Statistiques d'alignement issues du séquençage de la lignée gali1. Les résultats du séquençage par synthèse chimique sont détaillés dans ce tableau. La lecture « paired end » a générée 27.139.639 pour la première et la seconde lecture soit 54.279.278 lectures au total. La taille des lectures a été d'environ 100 pb. TAIR (The Arabidopsis Information Resource) est une annotation du génome, TAIR9 étant la version précédente de TAIR10. La cartographie de 93,75% des lectures de gali1 a pu être effectuée par rapport à TAIR10 et 77,81% par rapport à TAIR9. La profondeur de séquençage, c'est-à-dire le nombre de fois que le génome a été couvert, de la lignée gali1 est de 35,4.

Cette propriété est à la base de l'approche de mapping et explique la présence d'un « désert » de SNP, qui est la région non recombinante possédant la mutation d'intérêt. La fréquence des SNPs dans la population de mapping montre des variations naturelles reproductibles sur chaque chromosome (Figure C1 11). La région comprenant une forte diminution de la fréquence des SNPs aide à trouver des gènes candidats comprenant des mutations qui pourraient correspondre à celle qui est responsable du phénotype de résistance à la galvestine-1. Dans la lignée gali1, le désert de SNPs correspond à une région avec une très forte diminution de la fréquence des SNPs (Figure C1 11) sur le bras inférieur du chromosome 1. Le fait d'avoir une forte diminution de la fréquence plutôt qu'un désert de SNPs pourrait être dû au fait qu'un hétérozygote ait pu être sélectionné parmi les homozygotes de gali1.

Après l'analyse bio-informatique, la région d'intérêt contient 3 candidats comprenant des mutations qui pourraient correspondre à celle qui est responsable du phénotype de

résistance à la galvestine-1. Parmi ces candidats se trouvent la protéine ZKT contenant un domaine PDZ, un domaine K-box et une région TPR (At1G55480), une protéine de la famille des core-2/1 branching β -1,6N-acétylglucosaminyltransferase (At1G62305) et une protéine de la famille des facteurs de terminaison de la transcription mitochondriale (At1G61980).

Une seconde analyse des données a permis d'identifier 4 autres gènes candidats. Parmi ces candidats se trouvent une protéine de la superfamille des hydrolases de type alpha/beta (AT1G52510), une protéine kinase transmembranaire riche en répétition de Leucine (AT1G56145), une protéine hypersensible aux variations de phosphate HSP4 (**H**ypersensitive to **P**i stavation **4**, AT1G58250) et une protéine de résistance aux maladies contenant des domaines LRR et NB-ARC (AT1G61310).

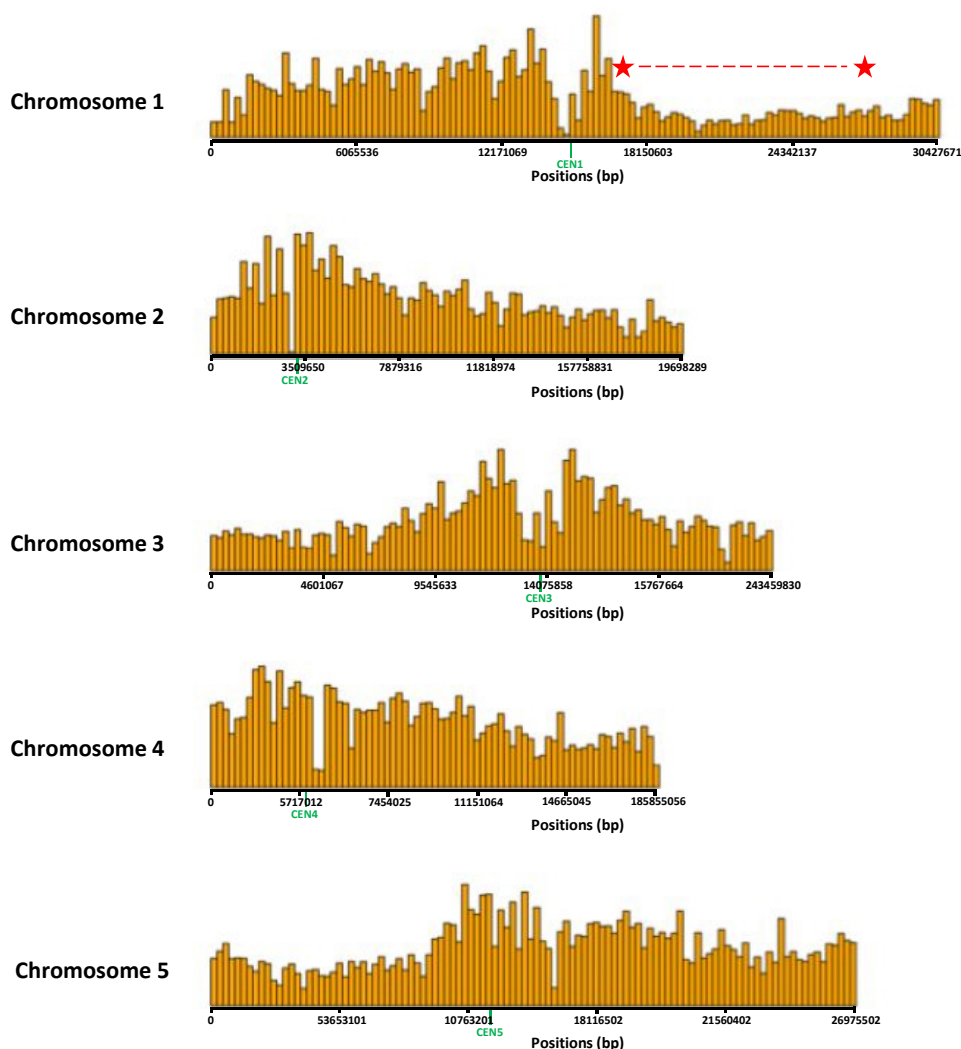


Figure C1 11 : Fréquences des SNPs sur les chromosomes de la population de mapping de la lignée gali1. Les SNPs filtrés ont été marqués à partir de leurs abondances sur chaque chromosome, en utilisant des classes de 250 kb. La région non-recombinante sur le bras inférieur du chromosome 1 est caractérisée par une forte diminution de la fréquence des SNPs (délimitée par les étoiles rouges).

b) Etude des candidats identifiés à partir du NGS

L'un des 7 candidats identifiés par l'analyse bio-informatique pourrait être le gène muté conférant la résistance à la galvestine-1.

J'ai engagé une analyse des 3 premiers gènes candidats décrits plus haut.

Le gène codant pour la protéine ZKT (At1G55480) contient un domaine PDZ, une région K-box et une région TPR (protéine à domaine PDZ, région **K**-box et région TPR). La mutation se situe sur la proline en position 295 de la séquence protéique pour donner une sérine, à la limite de la région TPR.

Un second candidat identifié est un gène codant pour une protéine de la famille des core-2/1 branching β -1,6N-acétylglucosaminyltransferase (At1G62305). La mutation touche une alanine en position 360 de la séquence protéique pour donner une thréonine.

Enfin le troisième candidat identifié est un gène codant pour une protéine de la famille des facteurs de terminaison de la transcription mitochondriale (At1G61980).

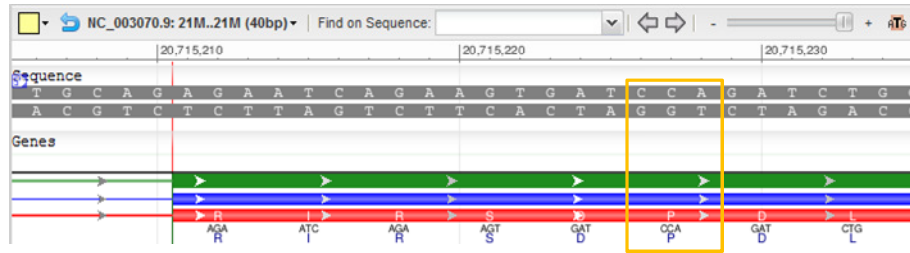
L'amplification et le séquençage de la région contenant la mutation ponctuelle dans les 3 gènes candidats dans la lignée gali1 ont été réalisés (Figure C1 12). Les résultats du séquençage du gène codant pour ZKT montrent que la mutation est retrouvée sur le codon CCA où une cytosine (C) est remplacée par une thymine (T) (Figure C1 12, A), correspondant à la proline identifiée lors du séquençage NGS. Ce séquençage confirme donc le résultat de l'analyse bio-informatique. Ensuite, le séquençage du gène de la protéine de la famille des core-2/1 branching β -1,6N-acétylglucosaminyltransferase montre que la mutation est aussi retrouvée sur le codon ACG où une cytosine (C) est remplacée par une thymine (T) (Figure C1 12), correspondant à l'alanine identifiée lors du séquençage NGS. Enfin, le séquençage du gène d'une protéine de la famille des facteurs de terminaison de la transcription mitochondriale indique de même que la mutation est retrouvée sur le codon TCT où une cytosine (C) est remplacée par une thymine (T), correspondant à la même sérine identifiée lors du séquençage NGS (Figure C1 12, C).

Les résultats du séquençage montrent que les 3 premiers gènes candidats identifiés après analyse bio-informatique du séquençage NGS, sont mutés dans la lignée gali1. Ces résultats confirment donc l'analyse bio-informatique du séquençage NGS. A ce stade, il n'est pas possible de savoir quel gène muté confère la résistance à la galvestine-1.

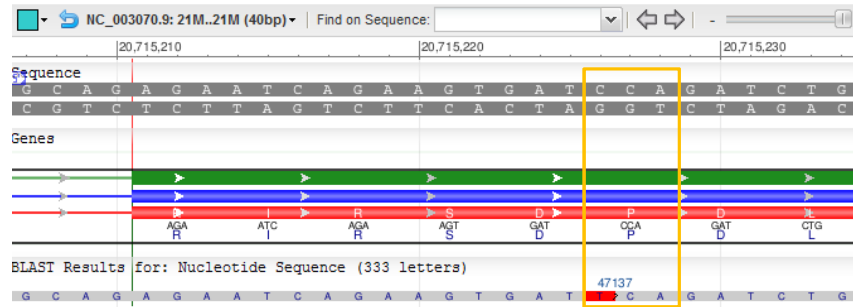
A

Séquençage du gène de ZKT

**Séquençage
NGS**



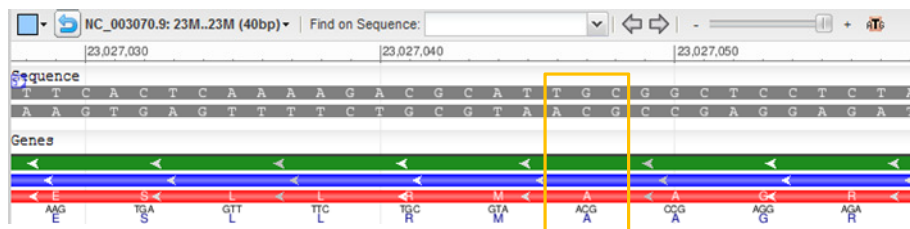
**Séquençage
direct**



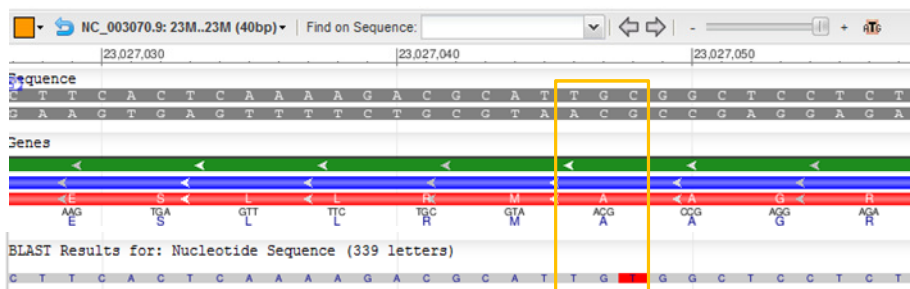
B

**Séquençage du gène codant pour une protéine de la famille des core-2/1
branching β 1,6N-acétylglucosaminyltransferase**

**Séquençage
NGS**



**Séquençage
direct**



C Séquençage du gène codant pour une protéine de la famille des facteurs de terminaison de la transcription mitochondriale



Figure C1 12 : Analyse des séquençages de 3 des 7 gènes candidats mutés dans la lignée gali1, pointés par l'étude cartographique. Les 3 gènes candidats mutés identifiés après analyse bio-informatique du séquençage NGS ont été séquencés dans la lignée gali1 (BC2F3) par séquençage classique. **A) Séquençage du gène codant pour la protéine ZKT.** La mutation identifiée par le séquençage NGS (encadré en jaune) touche une proline. En séquençage direct, la mutation est retrouvée sur le codon CCA où une cytosine (C) est remplacée par une thymine (T) (marqué en rouge), correspondant à la même Proline identifiée lors du séquençage NGS (encadré en jaune). **B) Séquençage du gène codant pour une protéine de la famille des core-2/1 branching β -1,6N-acétylglucosaminyltransferase.** La mutation identifiée par le séquençage NGS (encadré en jaune) touche une alanine. En séquençage direct, la mutation est retrouvée sur le codon ACG où une cytosine (C) est remplacée par une thymine (T) (marqué en rouge), correspondant à la même alanine identifiée lors du séquençage NGS (encadré en jaune). **C) Séquençage du gène codant pour une protéine de la famille des facteurs de terminaison de la transcription mitochondriale.** La mutation identifiée par le séquençage NGS (encadré en jaune) touche une sérine. En séquençage direct, la mutation est retrouvée sur le codon TCT où une cytosine (C) est remplacée par une thymine (T) (marqué en rouge), correspondant à la même sérine identifiée lors du séquençage NGS (encadré en jaune). Résultats du séquençage direct à partir du site Blast NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov/)

VI. Caractérisation de la lignée gali34

1. Information sur le type de mutation de gali34

La lignée gali34, isolée à partir du criblage, a fourni une génération de graines M3 qui a été testée sur galvestine-1 en condition du criblage. Les résultats ont montrés que gali34 présentait un phénotype résistant conservé dans la génération suivante (Figure C1 13, Tableau C1 1).

Chapitre 1

Pour cette lignée, deux backcross ont été réalisés et la génération F2 vient d'être obtenue. La caractérisation pourra être effectuée après un 3^{ème} backcross à partir de plantes gali34 homozygotes de génération F3 puisque la mutation est de type dominant.

Une caractérisation phénotypique préliminaire a été effectuée sur la lignée gali34. Les plantules gali34 cultivées en terre sont similaires au WT (Figure C1 14).

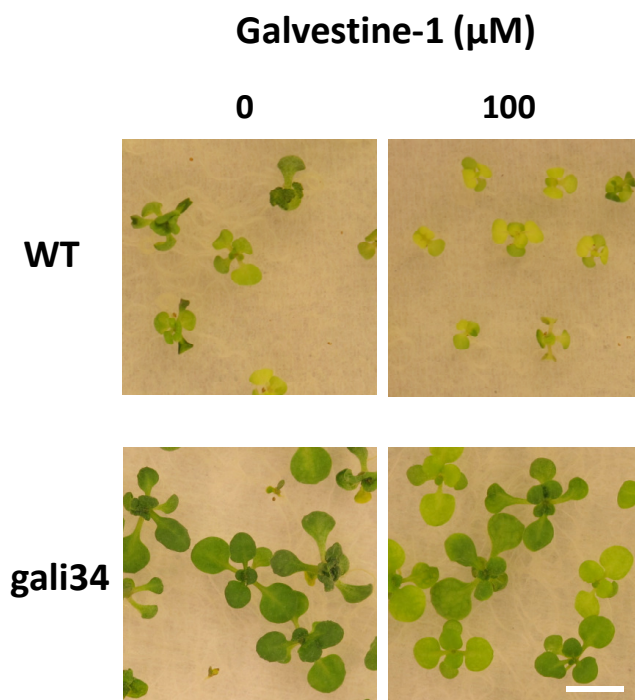


Figure C1 13 : Test de résistance à la galvestine-1 de la lignée gali34. Des graines de la lignée gali34 ont été stérilisées et ensemencées sur milieu Murashige et Skoog gélosé complété avec du saccharose 2% et avec de la galvestine-1 à 100 µM diluée dans du Tween-20 0,2%. Après stratification à 4°C pendant 2 jours dans l'obscurité, les plants ont été transférés en chambre de culture en cycle long, conservés à l'obscurité durant 3 jours, puis placées à la lumière en cycle long pour être observées sur une période de 15 jours. Sur 100 µM de galvestine-1, les plantules WT présentaient un phénotype sensible avec des feuilles chlorotiques et une taille réduite comparé au contrôle (0 µM). Les plantules gali34 présentaient un phénotype résistant avec une taille des plantules similaire à celle des plantules sur le milieu contrôle et des feuilles vertes. Barre d'échelle : 1 cm.

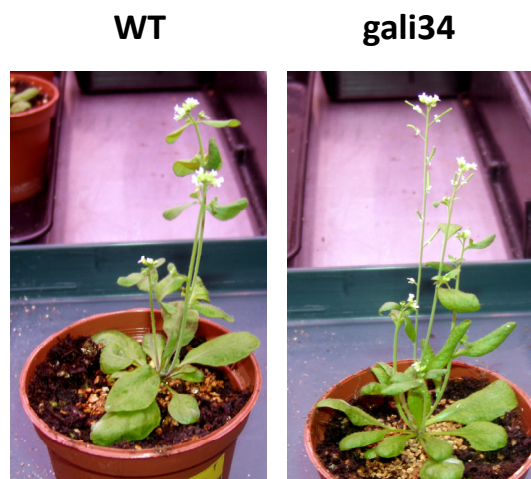


Figure C1 14 : Plantule *gali34* poussant en terre après avoir été sélectionné sur galvestine-1 suivant les conditions du crible. La plantule *gali34* (à droite) est pratiquement similaire au WT (à gauche).

2. Séquençage des gènes des MGDG synthèses dans la lignée *gali34*

Un séquençage des gènes *MGD1*, *MGD2* et *MGD3* a été réalisé dans la lignée *gali34* selon le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes. Comme pour la lignée *gali1*, aucune mutation dans les 3 gènes codant pour les MGDG synthèses n'a été détectée.

3. Séquençage des gènes candidats identifiés dans le génome de *gali1*

Comme décrit précédemment, l'étude de la lignée *gali1* a permis d'identifier 7 gènes candidats mutés. Un séquençage direct des régions contenant une mutation des 3 premiers gènes candidats étudiés chez *gali1* a été réalisée pour déterminer si une ces mutations se trouvaient aussi dans la lignée *gali34*. Les lignées *gali1* et *gali34* seraient alors considérés comme des mutants alléliques. Cependant, d'après les résultats du séquençage effectué, aucune mutation d'un des 3 gènes candidats n'est retrouvée dans *gali34*. Une étude semblable sera engagée à l'aide des 4 autres gènes candidats, potentiellement responsables du phénotype de *gali1*.

4. Localisation de la mutation dans le génome de gali34

En parallèle de la caractérisation phénotypique et de la purification de la lignée gali34, la localisation de la mutation conférant la résistance à la galvestine-1 a été réalisée par séquençage profond du génome de cette lignée .

a) Analyse bio-informatique des résultats du séquençage

NGS de la lignée gali34

Le séquençage par synthèse de la lignée gali34 a généré 50.327.076 lectures ou « reads » et la taille moyenne des inserts est de 442 bp (Figure C1 15). L'analyse a été menée comme décrit précédemment et les statistiques d'alignement sont données dans le Tableau C1 3. La profondeur de séquençage de la lignée gali34 est de 30,2. Le fait que la quantité de données et que la profondeur de séquençage soient très importantes indiquent que la cartographie est précise également.

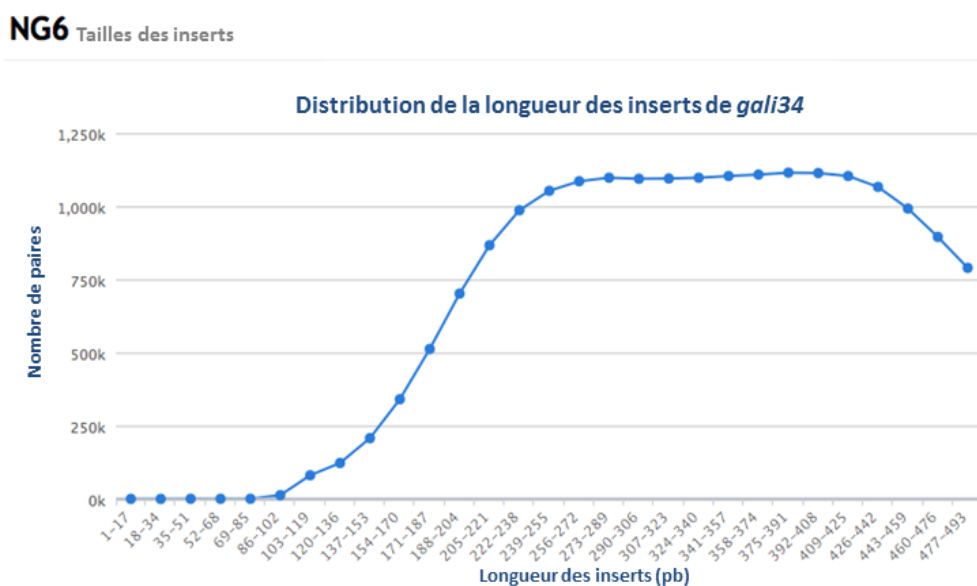


Figure C1 15 : Graphique de la répartition des tailles des inserts de la lignée gali34.

Chapitre 1

Nombre de lectures 1	25 163 538
Nombre de lectures 2	25 163 538
Paired	50 327 076
Taille des Lectures (pb)	100
Nombre de lectures cartographiées (TAIR10 tous les chromosomes)	46 238 688
Pourcentage de lectures cartographiées (TAIR10 tous les chromosomes)	91,88
Nombre de lectures cartographiées (TAIR9 tous les chromosomes)	35 966 548
Pourcentage de lectures cartographiées (TAIR9 tous les chromosomes)	71,46
Profondeur moyenne de séquençage	30,2

Tableau C1 3: Statistiques d'alignement issues du séquençage de la lignée gali34. Les résultats du séquençage par synthèse chimique sont détaillés dans ce tableau. La lecture « paired end » a générée 25.163.538 pour la première et deuxième lecture soit 50.327.076 lectures au total. La taille des lectures a été d'environ 100 pb. TAIR (The Arabidopsis Information Resource) est une annotation du génome, TAIR9 étant la version précédente de TAIR10. La cartographie de 91,88% des lectures de gali1 a pu être effectuée par rapport à TAIR10 et 71,46% par rapport à TAIR9. La profondeur de séquençage, c'est-à-dire le nombre de fois que le génome a été couvert, de la lignée gali1 est de 30,2.

Dans la lignée gali34, le désert de SNPs correspond à une région avec une diminution de la fréquence des SNPs (Figure C1 16) sur le bras inférieur du chromosome 4 et sur le bras supérieur du chromosome 5. Il est difficile d'observer un désert de SNP clairement délimité dans la lignée gali34, suggérant que quelques hétérozygotes ont été sélectionnés parmi les homozygotes gali34. Il reste donc des signaux résiduels de SNP.

b) Etude des candidats identifiés à partir du NGS

Après l'analyse bio-informatique, la région d'intérêt sur le chromosome 4 contient 2 candidats comprenant des mutations qui pourraient correspondre à celle qui est responsable du phénotype de résistance à la galvestine-1. Parmi ces candidats se trouvent un gène codant pour une 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (ISPH) (At4G34350). La protéine ISPH est une enzyme localisée dans le chloroplaste impliquée dans la voie non mévalonate de biosynthèse des isoprénoides, qui est directement reliée à la photosynthèse

Chapitre 1

(Hsieh and Goodman, 2005). Les isoprénoïdes représentent un large groupe retrouvé dans de nombreux organismes. Chez les plantes, les isoprénoïdes les plus importants sont les caroténoïdes et les chlorophylles. Une mutation sur ISPH pourrait donc conduire à une perturbation de la biosynthèse des isoprénoïdes et toucher la photosynthèse et indirectement la biogenèse chloroplastique, conduisant à une résistance à la galvestine-1.

Un autre gène candidat identifié code pour une protéine à domaine pleckstrine (At4G17140) qui lie les phospholipides. Enfin, sur le chromosome 5, le dernier candidat identifié est un gène muté pour une protéine inconnue (At5G13340) prédite dans le chloroplaste et à la mitochondrie (<http://aramemnon.uni-koeln.de/>).

Un séquençage de ces 3 gènes sera à réaliser afin de confirmer les résultats de l'analyse bio-informatique. Il faudra également effectuer un test de co-ségrégation du phénotype et des mutations pour savoir quelle mutation confère la résistance à la galvestine-1.

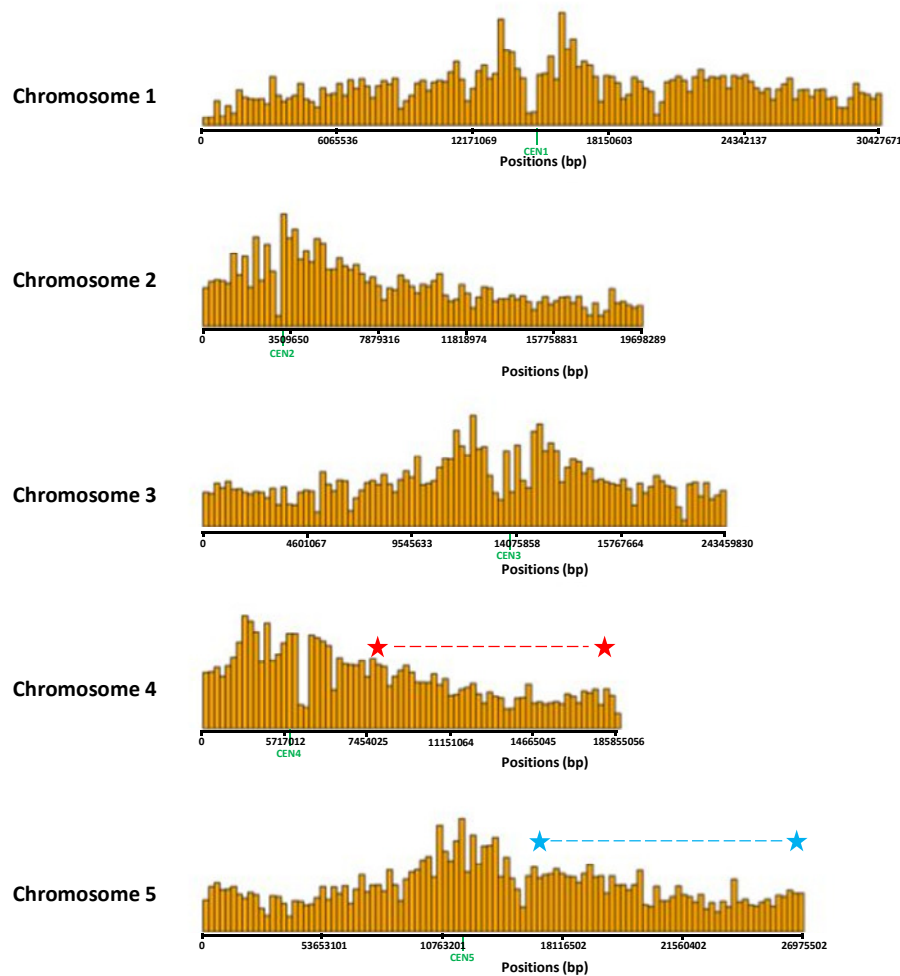


Figure C1 16 : Fréquences des SNPs sur les chromosomes de la population de mapping de la lignée gali34. Les SNPs filtrés ont été marqués à partir de leurs abondances sur chaque chromosome, en utilisant des classes de 250 kb. Les régions non-recombinantes sur le bras inférieur du chromosome 4 (délimitée par les étoiles rouges) et sur le bras inférieur du chromosome 5 (délimitée par les étoiles bleues) sont caractérisées par une diminution de la fréquence des SNPs.

VII. Caractérisation de la lignée gali2

1. Phénocopie du mutant *superman*

A l'issue du criblage, la lignée gali2 a été sélectionnée puis transférée en terre. Les plantules présentaient un phénotype fort au niveau des fleurs. En effet, une fleur provenant d'une plante contrôle (WT) a des pièces florales insérées sur les verticilles, c'est-à-dire en cercle autour d'un axe. Cette organisation est très précise et hautement régulée par plusieurs gènes du développement floral. Au centre se trouve le pistil, l'organe femelle de la fleur, entouré d'un verticille, l'androcée qui est formé de 6 étamines, les organes mâles (Figure C1 17). A la périphérie de la fleur se trouve un autre verticille, la corolle, formé de 4 pétales.

Dans les fleurs des plantes issues de la lignée *gali2*, les verticilles sont désorganisés et la symétrie de la fleur est perturbée (Figure C1 17). Le nombre d'étamines est plus élevé comparé à une fleur WT et cette lignée présente des défauts de fertilité. L'une des étamines est hypertrophiée (Figure C1 17, cerclé de rouge), sa base étant un pistil. Il s'agit donc d'une pièce florale à la fois mâle et femelle suggérant que les gènes du développement floral sont touchés. Des travaux antérieurs ont montré que le gène *SUPERMAN* aussi appelé *FLO10*, code pour un facteur de transcription régulant la frontière entre les verticilles mâle et femelle (Sakai et al., 2000). La lignée *gali2* semble phénocopier le mutant *flo10-1*, qui présente un nombre d'étamines plus élevé comparé à une fleur standard, avec des verticilles désorganisés et des problèmes de stérilité. Le mutant *flo10-1* a alors été commandé au SALK Institute (N6225) puis semé afin de récolter une génération F2. Un test de résistance à la galvestine-1 a ensuite été réalisé sur ces graines du mutant *FLO10*. Les résultats du test indiquent que le mutant *flo10-1* est sensible à la galvestine-1 car des feuilles chlorotiques sont observables (Figure C1 18). Cette étude suggère que la mutation provoquant ce phénotype floral, si elle correspondait à une altération de la fonction de *SUPERMAN*, est une mutation parasite qui ne confère pas de résistance à la galvestine-1. Après trois backcross, ce phénotype a effectivement été perdu dans la lignée *gali2*, confirmant cette conclusion.

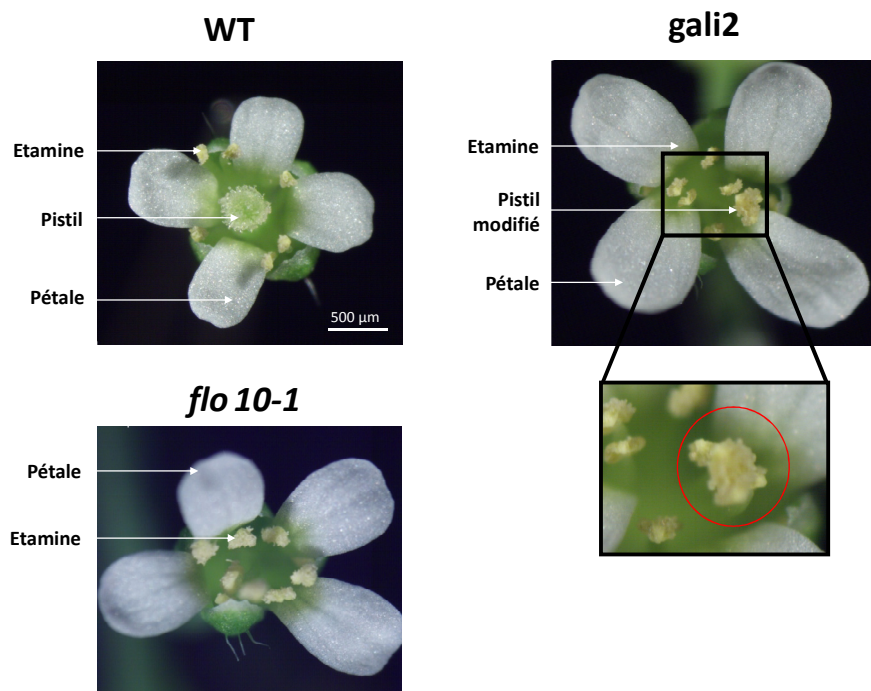


Figure C1 17 : La première génération de la lignée *gali2* phénocopie le mutant *flo10-1* au niveau des pièces florales. Les fleurs de plants contrôles (WT), de la lignée *gali2* et du mutant *flo10-1* sont observées à la loupe binoculaire. Une fleur provenant d'une plante WT est organisée en verticilles sur lesquels sont insérées les différentes pièces florales. Au centre est inséré le pistil, l'organe femelle, qui est entouré d'étamines, les organes mâles de la fleur. A la périphérie sont disposés les pétales. Dans la lignée *gali2*, la partie supérieure du pistil est une étamine (voir grossissement). Les verticilles sont désorganisés et le pistil modifié est excentré. Barre d'échelle : 500 μm .

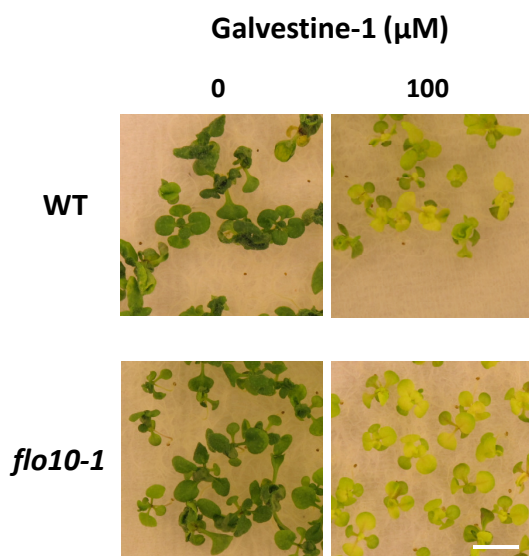


Figure C1 18 : Test de résistance à la galvestine-1 du mutant *flo10-1*. Des graines du mutant *flo10-1* et WT ont été stérilisées et ensemencées sur milieu Murashige et Skoog gélosé complété avec du saccharose 2% et avec de la galvestine-1 à 100 μM , diluée dans du Tween-20 0,2%. Après stratification à 4°C pendant 2 jours dans l'obscurité, les plantules ont été transférées en chambre de culture en cycle long, conservées à l'obscurité durant 3 jours, puis placées à la lumière pour être observées sur une période de 15 jours. Sur 100 μM de galvestine-1, les plantules WT présentaient un phénotype sensible avec des feuilles chlorotiques et une taille réduite comparé au contrôle (0 μM). Les plantules du mutant *flo10-1* présentaient également un phénotype sensible. Barre d'échelle : 1 cm.

2. Informations sur le type de mutation de gali2

Les tests de ségrégation de la mutation de résistance à la galvestine-1 ont été réalisés sur la génération F2 issue du 1^{er} backcross avec une plante contrôle. Les résultats ont montré que gali2 présentait un phénotype résistant transmis de génération en génération (Figure C1 19, Tableau C1 1) et que la mutation sous-jacente était dominante. Trois backcross ont pu être réalisés sur la lignée gali2, la génération F2 vient d'être obtenue. La caractérisation pourra être effectuée à partir de plantes gali2 homozygotes de génération F3 puisque la mutation est de type dominant.

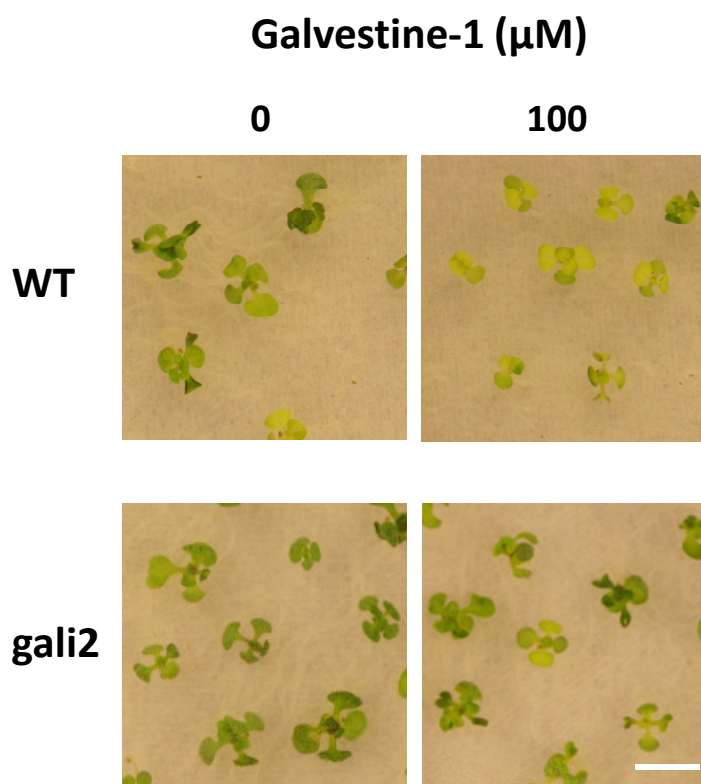


Figure C1 19 : Test de résistance à la galvestine-1 de la lignée gali2. Des graines de la lignée gali2 ont été stérilisées et ensemencées sur milieu Murashige et Skoog gélosé complété avec du saccharose 2% et avec de la galvestine-1 à 100 μM diluée dans du Tween-20 0,2%. Après stratification à 4°C pendant 2 jours dans l'obscurité, les plantules ont été transférées en chambre de culture en cycle long, conservées à l'obscurité durant 3 jours, puis placées à la lumière pour être observées sur une période de 15 jours. Sur 100 μM de galvestine-1, les plantules WT présentaient un phénotype sensible avec des feuilles chlorotiques et une taille réduite comparé au contrôle (0 μM). Les plantules de la lignée gali2 présentaient un phénotype résistant avec une taille des plantules similaire à celle des plantules sur le milieu contrôle et des feuilles vertes. Barre d'échelle : 1 cm.

3. Développement de la lignée gali2

Une caractérisation phénotypique préliminaire a été effectuée sur la lignée gali2 à partir de plantes homozygotes issues de la F4 d'un 1er backcross (gali2 BC1F4). Après les 3 backcross, les plantules gali2 cultivée en terre sont similaires au WT (Figure C1 20).

Des plantules gali2 et WT ont été cultivées suivant les conditions du criblage pendant 15 jours. Les plantules WT et les plantules gali2 présentant un phénotype résistant ont été ensuite transférées en terre. Un échantillon de feuille de plantule gali2 et WT ont été observées à 25 jours en microscopie confocale. Les chloroplastes ont été visualisés par autofluorescence de la chlorophylle (Figure C1 21). Les chloroplastes de la plantule gali2 ne présentent pas de différences phénotypiques visibles comparés au WT. Cette observation doit bien entendu être menée sur des plantules cultivées en présence de galvestine-1.



Figure C1 20 : Plantule gali2 cultivée en terre après avoir été sélectionné sur galvestine-1 suivant les conditions du crible. La plantule gali2 (à droite) est pratiquement similaire au WT (à gauche).

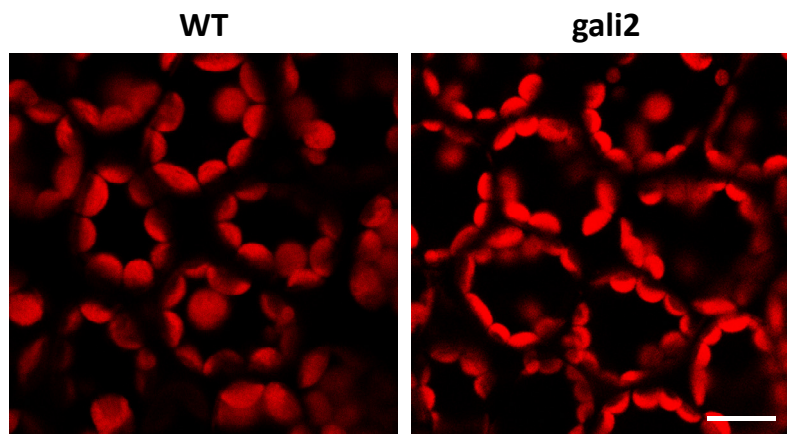


Figure C1 21 : Observation des chloroplastes à partir de feuilles de plantules gali2 et WT, en présence de galvestine-1. Des plantules gali2 et des plantules contrôles Col^{er105} (WT) ont été cultivées 3 jours à l'obscurité puis 12 jours à la lumière en cycle long, sur un milieu gélosé complété avec de la galvestine-1 à 100 μ M et 2% de saccharose. A 15 jours, les plantules WT et les plantules gali2 présentant un phénotype résistant ont été ensuite transférées en terre. Un échantillon de feuille de plantule gali2 et WT ont été observées à 25 jours en microscopie confocale. Les chloroplastes ont été visualisés par autofluorescence de la chlorophylle. Les chloroplastes de la plantule gali2 ne présentent pas de différences phénotypiques comparés au WT. Barre d'échelle : 10 μ m.

4. Caractérisation du profil lipidique de la lignée gali2

Une analyse glycérolipidique a été réalisée à partir de plantules gali2 BC1F4 homozygotes (Figure C1 22). Le profil d'acides gras totaux de la lignée gali2 ne se distingue pas de celui de la plante contrôle Col^{er105} en condition standard de culture. Toutefois, comme pour gali1, le niveau de C16:0 semble plus élevé dans la lignée gali2 en présence de galvestine-1. Lorsqu'on analyse les lignées indépendamment, les plantules gali2 montrent une diminution significative du niveau de C16:0 et une augmentation significative de C18:3 en présence de galvestine-1 (Figure C1 22, A).

L'analyse des différentes classes lipidiques de la lignée gali2 présente un niveau de MGDG significativement plus élevé comparé au WT en absence et en présence de galvestine-1 (Figure C1 22, B). La mutation conférant une résistance à la galvestine-1 induit vraisemblablement une production de MGDG plus importante dans la lignée gali2, ce qui est cohérent avec le fait que la lignée puisse développer des membranes photosynthétiques en présence de l'inhibiteur et qu'elle présente un phénotype avec des feuilles vertes. La croissance des plantules gali2 est comparable à celle des plantules WT sur un milieu standard. Le profil en acyls du MGDG ne présente aucune différence entre la lignée gali2 et le WT (Figure C1 22, C).

Par contraste avec gali1, les teneurs en DGDG dans la lignée gali2 sont similaires à ceux du WT en conditions standard et en présence de galvestine-1 (Figure C1 22, B). Le

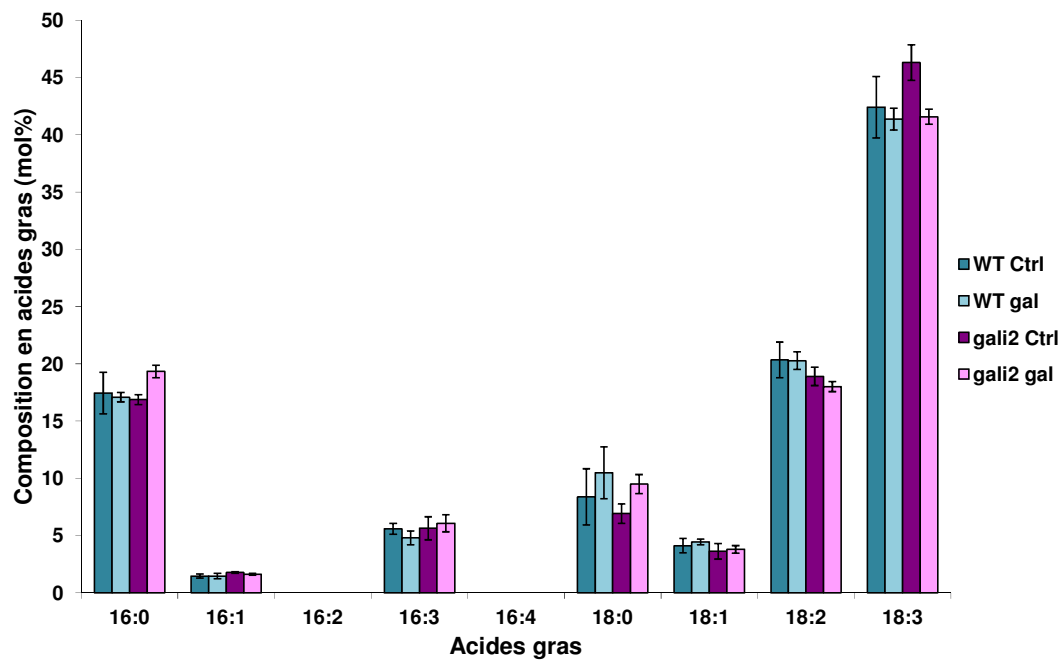
profil en acyls du DGDG de *gali2* ne montrent pas de différences significatives avec le DGDG analysé à partir d'extraits lipidiques de WT (Figure C1 22, D)

En condition standard ou en présence de galvestine-1, le niveau de PG est, comme pour *gali1*, légèrement supérieur dans la lignée *gali2* comparée au WT (Figure C1 22, B). La mutation conférant la résistance à la galvestine-1 semble donc aussi être liée à une augmentation de la production de PG. L'analyse du profil en acyls du PG indique que les plantules traitées en présence de galvestine-1 montrent une teneur plus faible du C18:2 dans le PG de *gali2* (Figure C1 22, E). Il est intéressant de noter que le PG a un niveau basal de C16:1 significativement plus élevé comparé au WT (Figure C1 22, E).

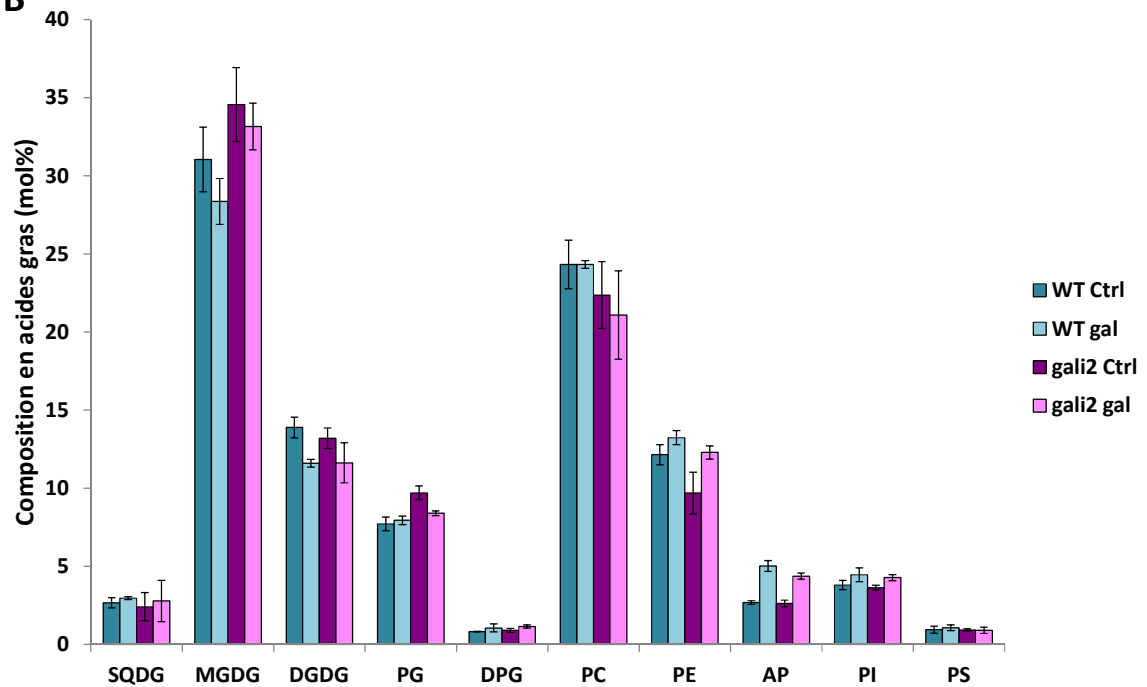
Concernant les phospholipides synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique, les teneurs en PC et PE sont légèrement plus faibles dans la lignée *gali2* alors que PS, PI et PA montrent des teneurs et évolutions semblables au WT (Figure C1 22, B). Concernant le phospholipide majeur, la PC, le profil en acyls présente une teneur significativement plus faible en C18:2 dans la lignée *gali2* comparé au WT, que ce soit en condition contrôle ou en présence de galvestine-1, et une teneur plus importante en C16:0 et C18:3 (Figure C1 22, F). Le profil en acyls de la PE présente une tendance semblable à celle observée pour la PC, avec une teneur plus élevée en C16:0 et une teneur plus faible en C18:2; de plus la teneur en C18:0 est significativement supérieure dans la lignée *gali2* (Figure C1 22, G). La PS, qui est en quantité plus faible dans les extraits lipidiques, et présente donc une variabilité d'analyse plus grande, est aussi plus riche en C16:0 et C18:0 et appauvrie en C18:2 dans la lignée *gali2* (non montré). L'analyse du profil en acyls du PI montre un niveau de C16:0 légèrement plus élevé dans la lignée comparé au WT (non montré). La proportion en AP ne montre pas de différence significative entre le WT et *gali2* au cours du traitement en galvestine-1. Le profil en acyls ne présente aucune différence significative (non montré).

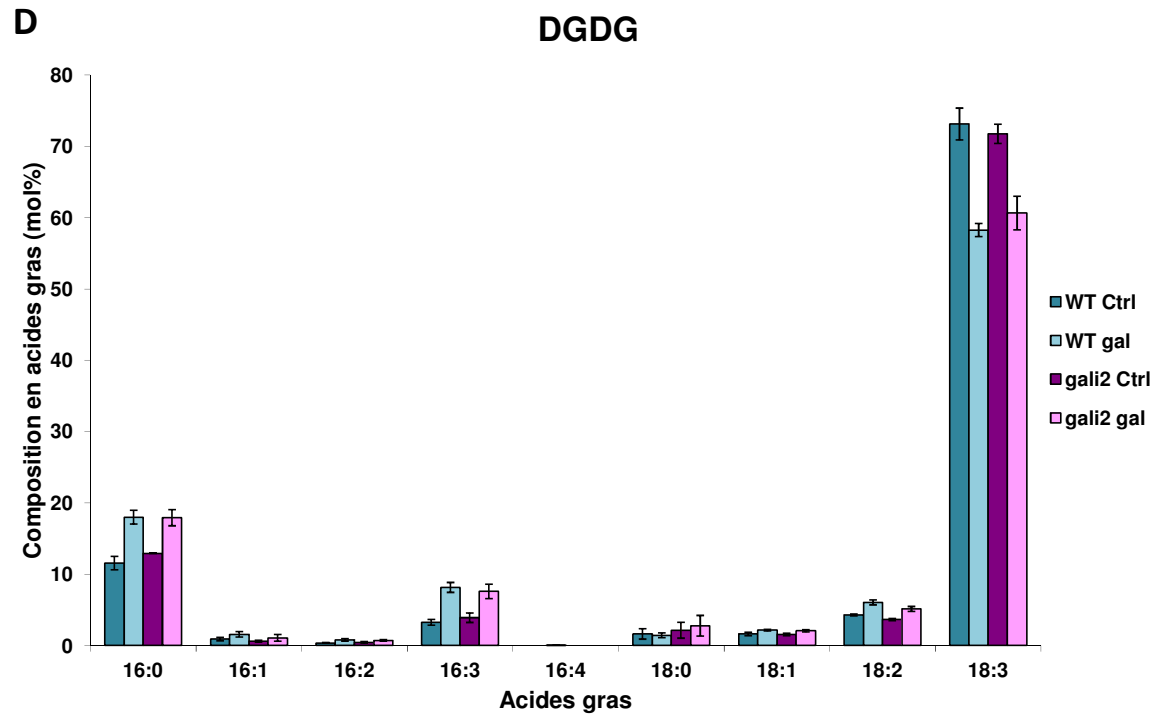
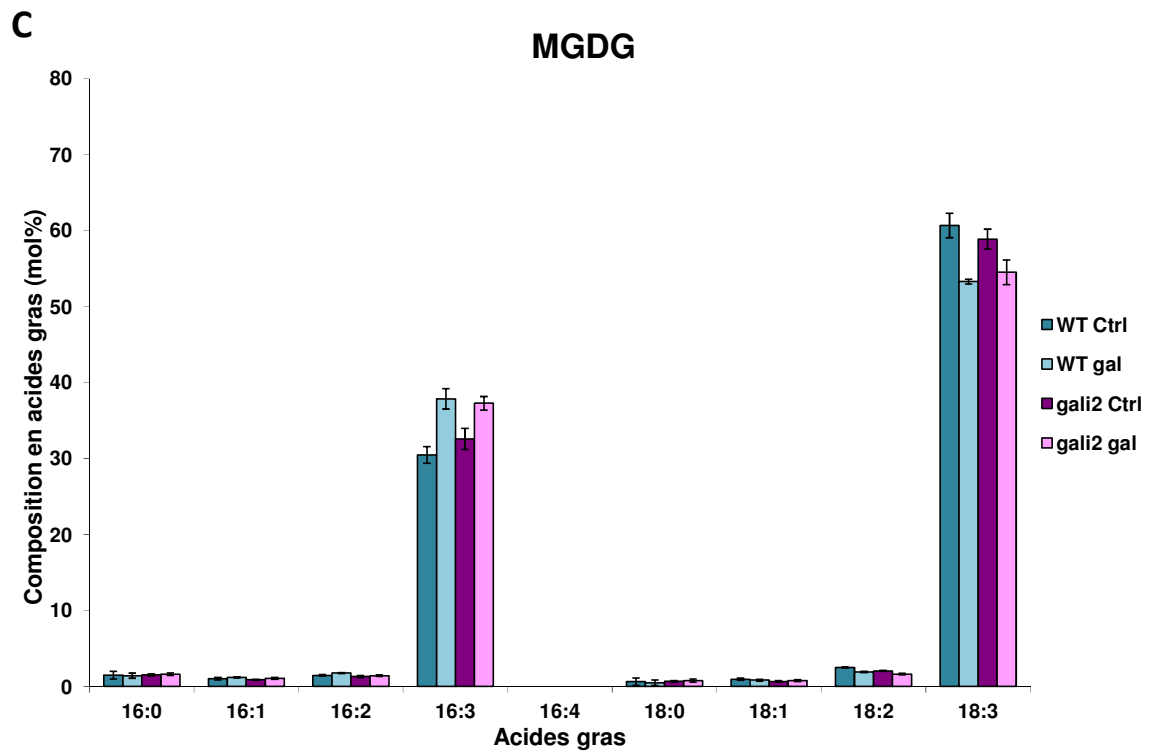
Ensemble, ces résultats indiquent que la mutation de *gali2* semble provoquer une augmentation de la synthèse de MGDG en présence de galvestine-1. Le niveau de PG est plus élevé dans la lignée *gali2* comparé au WT malgré une diminution de la production dû aux effets de la galvestine-1. L'analyse du profil en acyl du PG suggère, suivant la signature C16:1t, qu'il s'agit du PG thylacoïdien produit par la voie procaryote. Comme pour la lignée *gali1*, l'ensemble de ces résultats est cohérent avec une biogenèse des lipides chloroplastique protégée de l'effet de la galvestine-1.

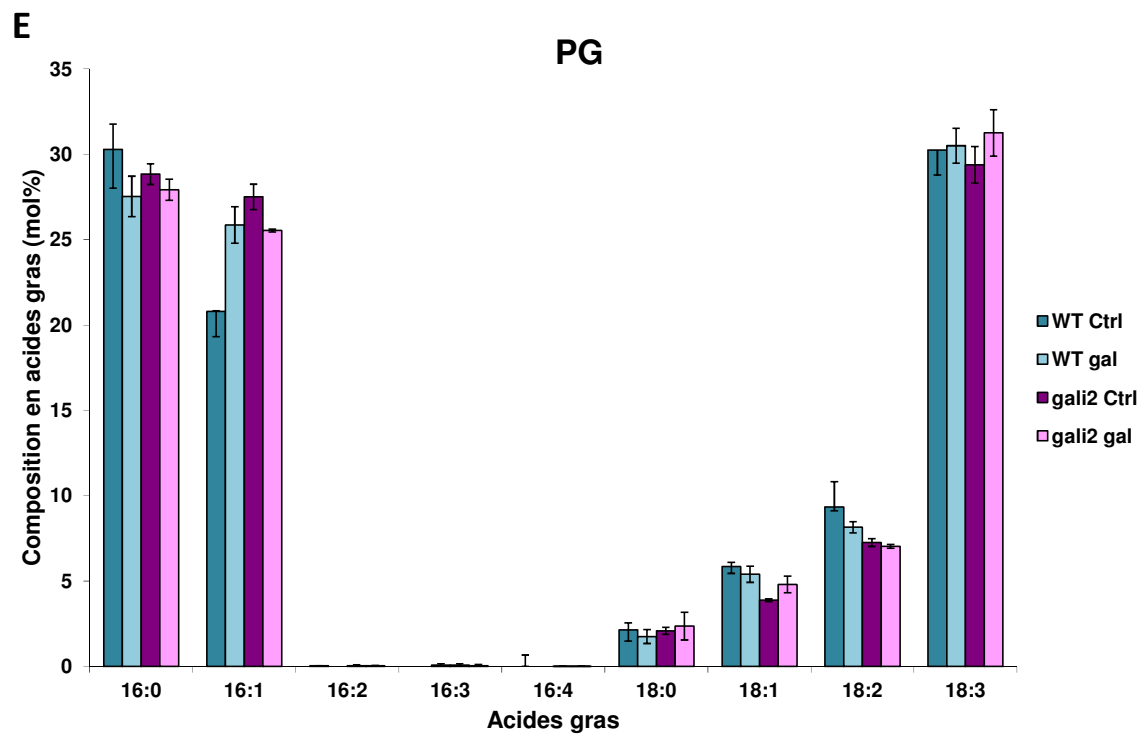
A



B







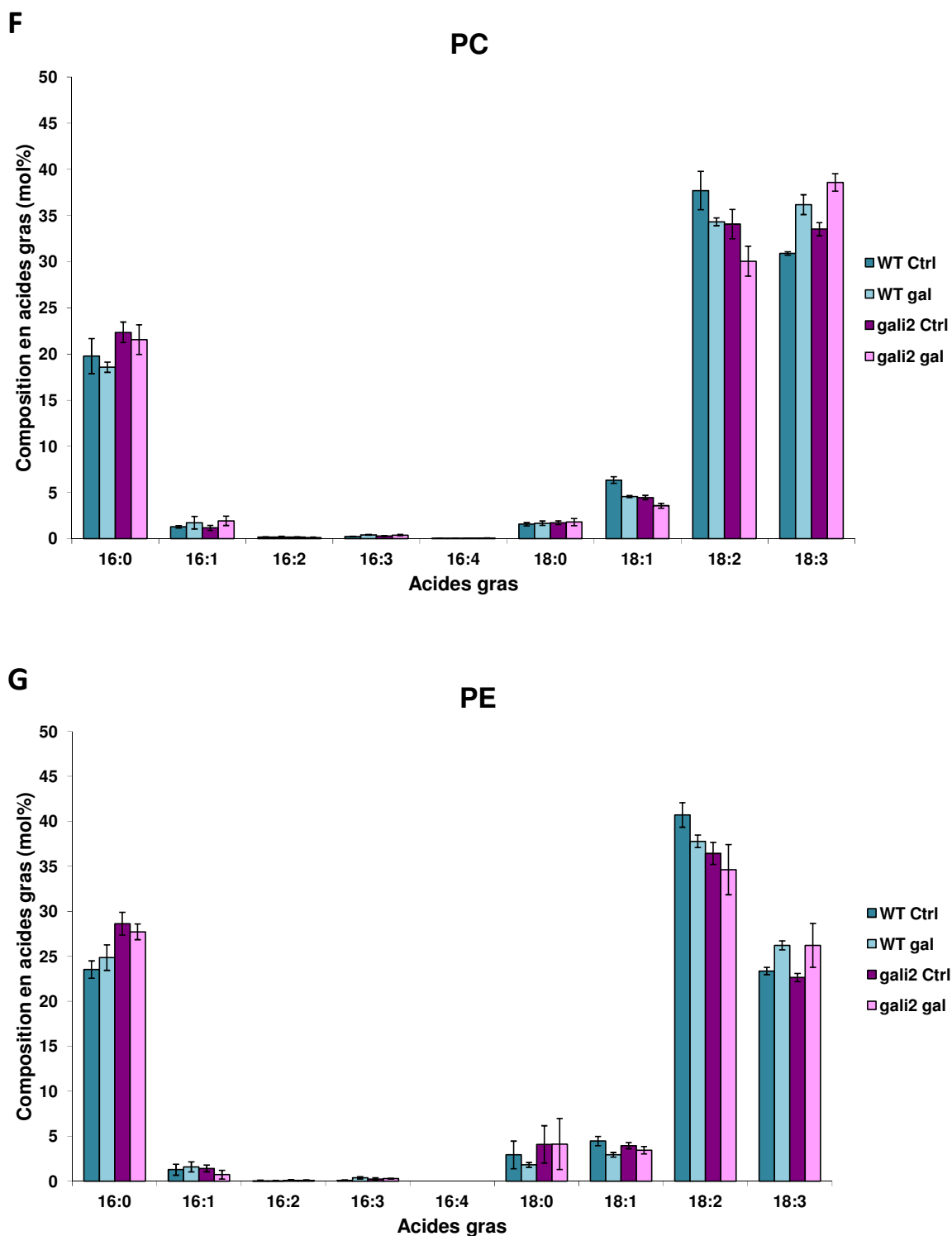


Figure C1 22 : Profil lipidique de rosettes gali2 traitées en présence de galvestine-1. Des plantules homozygotes gali2 issues de la F4 (1 backcross ; gali2 BC1F4) et des plantules contrôles Col^{er105} (WT) ont été cultivées sur un milieu Murashige et Skoog gélosé complété avec du saccharose 2% et avec de la galvestine-1 à 100 μ M diluée dans du Tween-20 0,2% (galv) ou sur un milieu contrôle de même composition sans galvestine-1 (Ctrl), dans les conditions du crible. Après 15 jours de croissance, les plantules ont été récoltées et congelées dans de l'azote liquide pour réaliser une extraction lipidique. Les lipides ont été extraits et séparés par chromatographie sur couche mince en 2 dimensions. **A) Analyse des acides gras totaux.** Chaque acide gras a été quantifié par chromatographie gazeuse. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs de 3 expériences indépendantes et la composition en lipide est exprimée en fonction du pourcentage de lipides totaux. **B) Analyse des classes lipidiques.** Chaque classe de glycérolipides a été quantifiée par chromatographie

gazeuse. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs de 3 expériences indépendantes et la composition en lipide est exprimée en fonction du pourcentage de lipides totaux. **C) Profil en acyls du MGDG. D) Profil en acyls du DGDG. E) Profil en acyls du PG. F) Profil en acyls de la PC. G) Profil en acyls de la PE.** Les profils ont été déterminés à partir de plantules homozygotes *gali2BC1F4* et de plantules contrôles (*Col^{er105}*). La composition en acides gras a été déterminée après méthanolyse et analyse des méthyl esters d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse et détection à ionisation de flamme. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs de 3 expériences indépendantes et la composition en lipide est exprimée en fonction du pourcentage de lipides totaux. Les barres d'erreur représentent la SEM (standard error of the mean) sur les 3 expériences indépendantes. DGDG, digalactosyldiacylglycérol ; MGDG, monogalactosyldiacylglycérol ; PE, phosphatidylethanolamine ; PG, phosphatidylglycérol ; PI, phosphatidylinositol et PS, phosphatidylsérine.

5. Séquençage des gènes des MGDG synthases dans *gali2*

Le séquençage des gènes *MGD1*, *MGD2* et *MGD3* a été réalisé dans la lignée *gali2*. Aucune mutation dans les 3 gènes codant pour les MGDG synthases n'a été observée.

6. Séquençage des gènes candidats identifiés dans le génome de *gali1*

Un séquençage direct des régions contenant une mutation de 3 des 7 gènes candidats identifiés après l'analyse approfondie du génome de *gali1* a été réalisée pour déterminer si une de ces mutations se trouvait aussi dans la lignée *gali2*. Les lignées *gali1* et *gali2* seraient alors considérées comme des mutants alléliques. Cependant, d'après les résultats du séquençage, aucune mutation d'un de ces 3 gènes candidats n'est retrouvée (non montré). La même étude devra être menée avec les 4 autres gènes candidats.

VIII. Caractérisation de la lignée *gali7*

1. Information sur le type de mutation de *gali7*

La lignée *gali7*, isolée à partir du criblage, a fourni une génération de graines M3 qui a été testée sur *galvestine-1* en condition du criblage. Les résultats ont montrés que *gali7* présentait un phénotype conservé de génération en génération (Figure C1 23, Tableau C1 1). Deux backcross ont pu être réalisés sur la lignée *gali7*. La caractérisation pourra être effectuée à partir de plantes *gali7* homozygotes de génération F3 puisque la mutation est dominante.

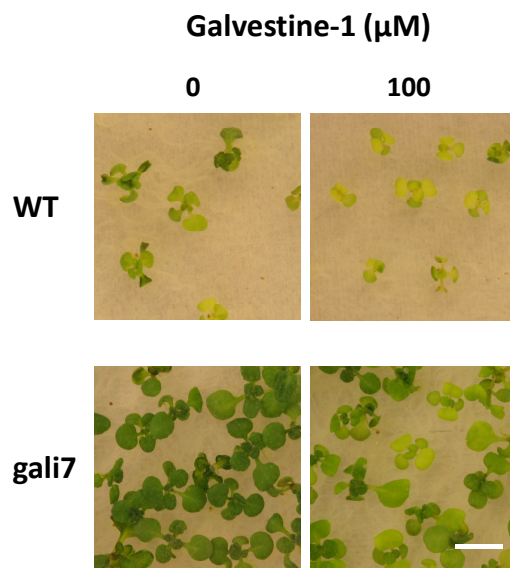


Figure C1 23 : Test de résistance à la galvestine-1 de la lignée gali7. Des graines de la lignée gali7 ont été stérilisées et ensemencées sur milieu Murashige et Skoog gélosé complété avec du saccharose 2% et avec de la galvestine-1 à 100 μM diluée dans du Tween-20 0,2%. Après stratification à 4°C pendant 2 jours dans l'obscurité, les plantules ont été transférées en chambre de culture en cycle long, conservées à l'obscurité durant 3 jours, puis placées à la lumière pour être observées sur une période de 15 jours. Sur 100 μM de galvestine-1, les plantules WT présentaient un phénotype sensible avec des feuilles chlorotiques et une taille réduite comparé au contrôle (0 μM). Les plantules gali7 présentaient un phénotype résistant avec une taille des plantules similaire à celle des plantules sur le milieu contrôle et des feuilles vertes. Barre d'échelle : 1 cm.

2. Développement de la lignée gali7

La lignée gali7 a été isolée lors du criblage puis transférée en terre. Les plantes de la lignée gali7 étaient alors similaires au WT après quelques jours de culture. La génération M3 a ensuite été obtenue et semée sur galvestine-1. Certaines plantules résistantes ont été transférées en terre et ont montré un phénotype particulier, appelé ici phénotype « salade » (Figure C1 24). Ce phénotype est caractérisé par un nombre de feuilles beaucoup plus élevé comparé au WT (non quantifié) et plus larges (non quantifiées). Ce phénotype se conserve après 2 backcross, et pourrait donc être lié à la résistance à la galvestine-1. Un dernier backcross devra permettre d'établir si la mutation de résistance à la galvestine-1 ségrège avec ce phénotype. En effet, toutes les plantes de la lignée gali7 ne présentent pas ce phénotype, par exemple dans la génération F1 issue d'un backcross, dont les individus sont tous hétérozygotes, mais plutôt dans la F2. Ce résultat suggère que ce phénotype pourrait s'exprimer lorsque les plantes gali7 homozygote. Dans la lignée gali7, la floraison est tardive et décalée d'environ 3 semaines après les plantes contrôles.



Figure C1 24 : Plantule gali7 poussant en terre après avoir été sélectionné sur galvestine-1 suivant les conditions du crible. La plantule gali7 (à droite) issue d'un premier backcross (1 backcross, gali7 BC1F3) présente un phénotype salade avec un nombre de feuilles plus élevé et plus large comparé au WT (à gauche).

Des plantules gali7 et WT ont été cultivées suivant les conditions du criblage pendant 15 jours. Les plantules WT et les plantules gali7 présentant un phénotype résistant ont été ensuite transférées en terre. Un échantillon de feuille de plantule gali7 et WT ont été observées à 25 jours en microscopie confocale. Les chloroplastes ont été visualisés par autofluorescence de la chlorophylle (Figure C1 25). Les chloroplastes de la plantule gali7 ne présentent pas de différences phénotypiques visibles comparés au WT. Comme pour les autres lignées, il sera fondamental d'étudier le phénotype chloroplastique chez des plantes cultivées en présence de galvestine-1.

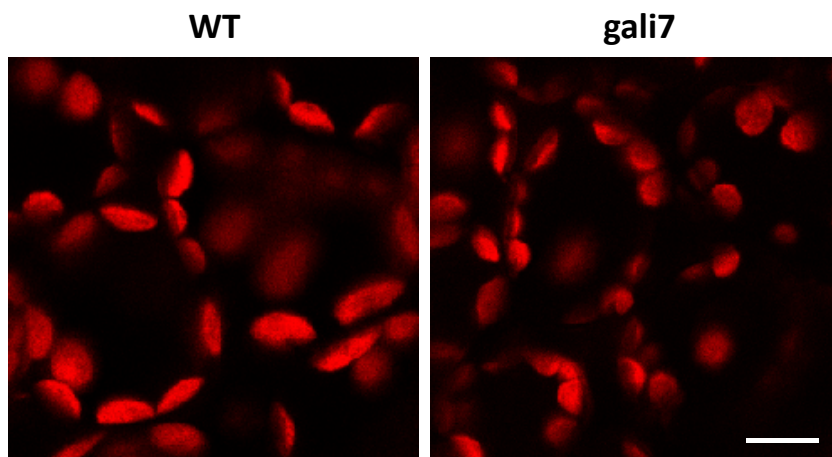


Figure C1 25 : Observation des chloroplastes de la lignée gali7 et WT en présence de galvestine-1. Des plantules gali7 et des plantules contrôles Col^{er105} (WT) ont été cultivées 3 jours à l'obscurité puis 12 jours à la lumière en cycle long, sur un milieu gélosé complété avec de la galvestine-1 à 100 μ M et 2% de saccharose. A 15 jours, les plantules WT et les plantules gali7 présentant un phénotype résistant ont été ensuite transférées en terre. Un échantillon de feuille de plantule gali7 et WT ont été observées à 25 jours en microscopie confocale. Les chloroplastes ont été visualisés par autofluorescence de la chlorophylle. Les chloroplastes de la plantule gali7 ne présentent pas de différences phénotypiques comparés au WT. Barre d'échelle : 10 μ m.

3. Séquençage des gènes des MGDG synthèses dans gali7

Le séquençage des gènes *MGD1*, *MGD2* et *MGD3* a été réalisé dans la lignée gali7. Aucune mutation dans les 3 gènes codant pour les MGDG synthèses n'a été détecté.

4. Séquençage des gènes candidats identifiés dans le génome de gali1

Comme pour les autres lignées présentées dans ce mémoire, le séquençage de 3 des 7 gènes candidats pointés lors de l'étude de gali1 a été réalisé et n'a pas permis de retrouver de mutation allélique. Le séquençage des 4 autres gènes candidats devra être entrepris.

IX. Discussion

a) Bilan provisoire du criblage.

Le criblage primaire et secondaire d'une collection de mutants EMS résistants à la galvestine-1 a permis de sélectionner 15 lignées gali. Pour la plupart, les mutations sont dominantes ce qui n'est pas classique pour ce type de criblage. Il s'agirait donc de mutations de type gain de fonction, qui apportent une résistance contre la galvestine-1, comme dans le cas d'une enzyme mutée modifiant sa conformation et son activité par exemple.

Il n'a pas été possible de déterminer le type de mutation pour les lignées gali8, gali12 et gali25 (Tableau C1 1). Cette difficulté peut être due à un problème de pénétrance de la mutation, c'est-à-dire que certaines plantes peuvent contenir la mutation conférant la résistance à la galvestine-1, mais ne pas exprimer le phénotype de résistance. Des mutations parasites peuvent être à l'origine de ce problème de pénétrance. Plusieurs backcross pourraient permettre de s'affranchir de ces mutations parasites et de résoudre ce problème de pénétrance.

Sachant que les mutations sont dominantes pour la majorité des lignées gali, il n'a pas été possible de réaliser des tests d'allélisme. Ce test consiste à croiser deux lignées. Si des plantules présentent un phénotype de résistance dans la génération F1, alors les lignées sont considérées comme des mutants alléliques.

Le fait d'avoir isolé, à partir du criblage, un nombre peu élevé de lignées résistantes pourrait indiquer qu'un faible nombre de voies spécifiques soient touchées. Plusieurs lignées gali pourraient être mutés dans la même voie ou être alléliques. La redondance des phénotypes lipidique des lignées gali1 et gali2 (Figure C1 9 et Figure C1 22) semble cohérente avec cette hypothèse. Une caractérisation plus précise des différentes lignées au niveau lipidique, protéique et transcriptomique sera réalisée sur des plantules homozygotes issues d'un 3^{ème} backcross pour ces lignées.

Enfin, les gènes candidats mutés identifiés par séquençage NGS de la lignée gali1 ont été confirmés par séquençage direct. Pour l'instant, il est difficile de savoir quel gène muté confère la résistance à la galvestine-1, un test de co-ségrégation est en cours pour répondre à cette question. Il s'agit d'un test évaluant quelle mutation co-ségrège avec le phénotype de résistance. Ce test est prévu également pour la lignée gali34, avec les gènes candidats mutés identifiés suite à l'analyse cartographique.

b) Gali1

La lignée *gali1* est similaire au WT au niveau de l'anatomie de la plante (Figure C1 7). Cependant, une floraison précoce de quelques semaines est observée chez la lignée *gali1* (non quantifié). Les tissus foliaires contiennent des chloroplastes ne présentant pas de différences phénotypiques comparés au WT. Cette observation devra être réalisée en présence de galvestine-1. L'analyse lipidique montre que la lignée *gali1* contient un niveau de MGDG plus élevé comparé à une plante standard en présence de galvestine-1 (Figure C1 9, B). En réponse à la présence de galvestine-1 qui induit une forte diminution de la synthèse des galactolipides, la lignée *gali1* met en place des mécanismes augmentant la production de MGDG. La mutation pourrait donc être localisée sur une enzyme impliquée dans la synthèse des galactolipides, modifiant ainsi son activité ou son affinité pour un substrat, ce qui impliquerait donc cette augmentation de la production de MGDG. Le séquençage des gènes des MGDG synthases ne montre pas de mutation et suggère qu'il pourrait s'agir d'un acteur en amont des MGDG synthases. Le niveau de DGDG ne diminue pas dans la lignée *gali1* contrairement à une plante standard traitée en présence de galvestine-1. Ce phénomène est peut être lié à l'augmentation de la synthèse de MGDG dans la lignée *gali1*, maintenant une production de DGDG stable. Enfin, le niveau de PG est augmenté dans la lignée *gali1* en présence de galvestine-1, tandis que le niveau de PG est stable chez la plante contrôle. L'analyse du profil en acyls montre une augmentation du C16:1 du PG, ce qui est caractéristique du PG thylacoïdien (C16:1t) (Wada and Murata, 2007). Chez *Arabidopsis*, environ 85% du PG thylacoïdien provient de l'AP procaryotique (Browse et al., 1986). Une désaturase spécifique du PG catalyse ensuite l'ajout d'une double liaison en conformation *trans* sur le C16:0 en position *sn*-2, produisant alors du C16:1t (Haverkate and van Deenen, 1965). De plus, des études ont montrées que le PG était un activateur de MGD1, conduisant à une stimulation de la synthèse de MGDG (Dubots et al., 2010). La mutation conférant la résistance à la galvestine-1 dans la lignée *gali1* pourrait donc toucher la voie procaryote au niveau de la synthèse du PG, qui activerait alors MGD1, augmentant donc la production de MGDG et maintenant la production de DGDG, compensant ainsi les effets de la galvestine-1.

Chez *Arabidopsis*, la proportion de MGDG, de DGDG et de PG est fortement régulée, dû à la présence de mécanismes établissant et contrôlant l'homéostasie lipidique des membranes thylacoïdiennes, selon le contexte environnemental et physiologique de la plante (Boudiere et al., 2013). De plus, ces glycérolipides sont associés spécifiquement avec des complexes protéiques incluant les photosystèmes et sont essentiels pour les structurer (Loll et

al., 2007; Mizusawa and Wada, 2012). Les proportions relatives de MGDG, DGDG et de PG sont également importantes pour obtenir une forme optimale des thylacoïdes. En effet dans les membranes thylacoïdiennes, le rapport MGDG/DGDG est important car le MGDG induit une courbure des membranes et le DGDG un effet stabilisateur (Bruce, 1998). La proportion de PG est en équilibre avec celle du sulfolipide SQDG, un autre lipide essentiel des membranes thylacoïdiennes. Ces deux lipides confèrent une charge négative à la membrane ce qui joue sur les propriétés physico-chimiques des membranes (Chow et al., 2005). Ainsi dans la lignée *gali 1* en présence de galvestine-1, l'augmentation de la production de MGDG, de DGDG et de PG, corrélée à la présence de la mutation, maintiendrait la forme optimale des thylacoïdes, préservant la structuration des photosystèmes, ce qui permettrait préserver le fonctionnement de la photosynthèse. Une mesure de l'activité photosynthétique de plantules *gali1* est prévue prochainement. L'observation en microscopie électronique des membranes thylacoïdiennes de la lignée pourrait également permettre d'apporter des informations complémentaires sur la structure des thylacoïdes.

Une caractérisation plus profonde devra être effectuée sur la lignée *gali1* purifiée par un 3^{ème} backcross et homozygotes pour la mutation de résistance à la galvestine-1. Cette étude permettra de vérifier les phénotypes observés à ce jour et éliminera d'éventuelles mutations parasites pouvant interférer avec les phénotypes.

L'analyse bio-informatique du séquençage NGS de la lignée *gali1* a permis d'identifier un gène muté codant pour la protéine ZKT. Cette protéine est composée d'un domaine PDZ, d'une boîte K et d'un domaine tétratricopeptide (Ishikawa et al., 2005). D'après la littérature, les domaines PDZ lient une partie de la région C-terminale de polypeptides modulent les interactions protéines-protéines ou protéines-lipides. Ce type de motif est retrouvé dans de nombreuses protéines de la signalisation (Jelen et al., 2003). La région contenant une boîte K joue un rôle dans la formation de multimères (Riechmann and Meyerowitz, 1997). Le domaine tétratricopeptide (TPR, **T**etratrico **P**eptide **R**epeat) est composé de motifs de 34 amino-acides répétés et médie les interactions protéines-protéines et l'assemblage de complexes multiprotéiques (D'Andrea and Regan, 2003). Les protéines contenant ces différents domaines sont appelées protéines adaptatrices et sont responsables de la transduction de signaux pour induire une réponse biologique. Après une blessure chez *Arabidopsis*, la protéine ZKT est sur-exprimée et phosphorylée sur des résidus thréonine et sérine (Ishikawa et al., 2005), ce qui induit un processus de signalisation, avec le recrutement de partenaires protéiques. La mutation est située au niveau d'une proline à la limite du

domaine tétratricopeptide, devenue alors une sérine. La proline joue un rôle important dans la conformation des protéines car elle induit la formation de coudes rigides dans la chaîne peptidique. Une sérine n'introduit pas de coudes dans la structure et peut être phosphorylée. Donc la mutation de la proline en sérine au niveau du domaine tétratricopeptide pourrait induire un changement de conformation de la protéine ZKT, provoquant une modification de son affinité avec plusieurs protéines partenaires et donc modifier la transduction des signaux. De plus, la protéine ZKT est prédite pour être localisée dans le chloroplaste chez *Arabidopsis* (Emanuelsson et al., 2000). Une hypothèse envisageable serait que la mutation du gène codant pour la protéine ZKT pourrait modifier la formation de complexes protéiques au niveau du chloroplaste, ce qui induirait des modifications de la transduction des signaux et conduire indirectement à une modification de la synthèse des galactolipides, expliquant ainsi les phénotypes de la lignée gali1. De plus, d'après les données transcriptomiques de plantes traitées en présence de galvestine-1 pendant 13 jours (Botte et al., 2011), seul le gène codant pour la protéine ZKT est sous-exprimée parmi tous les gènes candidats identifiés dans la lignée gali1.

La mutation dans le gène codant pour ZKT a été confirmée par séquençage direct de la région non recombinante identifiée par l'analyse bio-informatique du séquençage NGS. Cependant, les deux autres gènes candidats mutés codant pour la protéine de la famille des core-2/1 branching β -1,6N-acétylglucosaminyltransferase et pour une protéine de la famille des facteurs de terminaison de la transcription mitochondriale ont également été confirmés par séquençage direct. Les 4 autres candidats nouvellement identifiés par une seconde analyse n'ont pas été étudiés à ce jour. Un séquençage de ces gènes est en cours. Un test de co-ségrégation du phénotype et des mutations est en cours pour établir quelle mutation confère la résistance à la galvestine-1.

c) Gali2

L'étude préliminaire de la lignée gali2 a permis de caractériser en partie la mutation conférant la résistance à la galvestine-1. Après les 3 backcross, les plantules gali2 cultivées en terre sont similaires au WT (Figure C1 20) et aucun phénotype n'est observé au niveau des chloroplastes (Figure C1 21). Cette observation préliminaire des chloroplastes sera effectuée plus finement à partir de plantules homozygotes provenant de la lignée gali2 purifiée. Afin de

mieux observer les effets de la galvestine-1 sur les chloroplastes des différentes lignées gali, l'observation sera réalisée directement après 15 jours de culture en présence de galvestine-1.

L'analyse des lipides de la lignée gali2 montre que le niveau de MGDG, de DGDG et de PG thylacoïdien est plus élevé comparé à une plante contrôle. Lors de l'analyse de la lignée gali1, nous avons vu que ces lipides sont vitaux pour la plante et sont en lien étroit avec la photosynthèse (Loll et al., 2007; Mizusawa and Wada, 2012). Ces teneurs pourraient expliquer la résistance à la galvestine-1. L'analyse lipidique a été réalisée sur des plantules de la lignée gali2 provenant d'un backcross; il sera nécessaire d'effectuer à nouveau cette analyse sur des plantules issues de 3 backcross pour éliminer un maximum de mutations parasites interférant avec les phénotypes.

Bien que ces observations au niveau lipidiques soient redondantes avec celles de la lignée gali1, il est possible que la mutation soit différente. En effet, le séquençage de 3 des 7 gènes identifiés lors de l'analyse bio-informatique indique qu'aucune mutation n'est retrouvée dans la lignée gali2. Le séquençage des 4 gènes identifiés lors de la deuxième analyse des données de la lignée gali1 est prévue. Le séquençage des MGDG synthases indique qu'aucune mutation n'est retrouvée dans *MGD1*, *MGD2* ou *MGD3*. Le gène muté pourrait donc coder pour une protéine impliquée dans un processus en amont des MGDG synthases. Une stimulation de MGD1 par le PG (Dubots et al., 2010) pourrait être un des éléments reliant le niveau le plus élevé de PG dans la lignée gali2 et la teneur en MGDG. Le maintien de la production de MGDG, de DGDG et de PG thylacoïdien pourrait permettre au chloroplaste de préserver ses structures et de garder un fonctionnement de la photosynthèse optimal malgré la présence de galvestine-1. Une mesure de l'activité photosynthétique de plantes gali2 est prévue prochainement. L'observation en microscopie électronique des membranes thylacoïdiennes de la lignée pourrait également permettre d'apporter des informations complémentaires sur la structure des thylacoïdes.

d) Autres lignées Gali

Les études des lignées gali1, gali2 et gali34 détaillées ici sont les plus avancées. Il sera important de se focaliser sur ces lignées pour conclure sur les premiers gènes impliqués dans l'homéostasie lipidique découverts par une approche de génétique chimique. Un séquençage des gènes candidats de la lignée gali34 est initié pour savoir si l'une des mutations peut être retrouvée dans les lignées gali1, gali2, gali7 et confirmer les résultats dans la lignée gali34.

Chapitre 1

Les autres lignées en cours d'étude sont soigneusement stockées. Des analyses futures par séquençage direct permettront d'établir pour ces dernières s'il s'agit de mutants alléliques de *gali1*, 2 ou 34. Dans le cas de mutant alléliques, leur étude phénotypique enrichira notre compréhension de la fonction remplie par le gène muté correspondant. Dans le cas de mutants non-allélique, une analyse visant à cartographier la mutation impliquée sera engagée suivant la stratégie décrite dans ce mémoire.

Chapitre 2 : Analyse préliminaire du rôle d'*ALA10* dans la réponse au traitement par la galvestine-1

Chapitre 2 : Analyse préliminaire du rôle d'*ALA10* dans la réponse au traitement par la galvestine-1

I. Introduction

1. Fouille des variations du transcriptome d'*Arabidopsis thaliana* induites par une exposition à la galvestine-1

En complément de l'étude sans *a priori* présentée précédemment, visant à identifier de nouveaux acteurs impliqués dans l'homéostasie des lipides, nous avons aussi analysé des gènes candidats sélectionnés suivant les deux critères suivants: une expression réprimée ou induite en réponse à un traitement en présence de galvestine-1 et une annotation suggérant un rôle possible dans le métabolisme et le trafic des glycérolipides. Nous avons donc examiné les résultats d'une étude du transcriptome de plants d'*Arabidopsis* traités en présence de galvestine-1, réalisée précédemment au laboratoire (Botte et al., 2011). Dans cette étude, l'expression des ARNm extraits de feuilles de rosettes a été mesurée après des traitements courts (3 jours) ou longs (13 jours) en présence de 0, 100 μ M (IC50, concentration d'inhibition de la croissance à 50% de l'effet maximal) et 200 μ M (IC90, concentration d'inhibition de la croissance à 90% de l'effet maximal) de galvestine-1, diluée dans du DMSO, les IC50 et IC90 ayant été *de facto* établies dans ces conditions de traitement. Les profils d'expression des ARNm ont été déterminés par hybridation sur puce Affymetrix *Arabidopsis* ATH1 genome array GeneChip. Les altérations des niveaux de transcrits ont été définies par comparaison avec des plantes contrôles traitées en présence du solvant "véhicule" (DMSO 1%). Les données de microarray ont ensuite été validées par des mesures de RT-PCR quantitatives effectuées à partir de plantes traitées en présence de galvestine-1, ou de son analogue inactif, A1B1C0. Les traitements courts et longs ont induit des modifications au minimum d'un facteur deux, pour 599 et 784 gènes respectivement ($P < 0.05$). Les profils d'expression des gènes impliqués dans l'assemblage des galactolipides au sein de l'enveloppe, *i.e.* *MGD1*, *MGD2*, *MGD3*, *DGD1* et *DGD2*, n'ont pas montré de changement important au cours de ces divers traitements. De la même façon, l'expression des gènes codant pour les acyltransférases plastidiales de la voie procaryotique, *i.e.* *ATS1* et *ATS2*, et de ceux impliqués

dans l'assemblage du phosphatidylglycérol dans l'enveloppe plastidiale, *i.e.* *PGP1* et *PGPS2* n'a pas été fortement affectée suite au traitement en présence de galvestine-1.

Botté et al., (2011) ont recherché des gènes dont l'expression suivait un patron commun en fonction de la dose de galvestine-1, à l'aide d'une méthode de clustering à noyaux (Kernel method, K-mean). Ce traitement des données a ainsi permis d'identifier un unique cluster de 527 gènes réprimés (down-regulated = DR) en fonction de la durée ou de la concentration en inhibiteur (Cluster DR1). Les 182 gènes dont l'expression est induite (up-regulated = UR) ont été classés en 3 groupes: 69 gènes surexprimés après une exposition courte en présence de galvestine-1, 90 gènes avec un patron d'expression croissant avec la durée et la concentration en inhibiteur, et enfin 23 gènes surexprimés de façon égale dans toutes les conditions (Clusters UR1, UR2 et UR3, respectivement). Dans chacun de ces clusters, et tenant compte de l'annotation des gènes, Botté et al. (2011) ont recherché les termes de la "gene ontology" (GO) qui étaient sur-représentés par rapport à la fréquence de ces termes mesurée dans l'ensemble du génome. Les gènes annotés dans les clusters DR et UR montrent ainsi un enrichissement significatif en gènes codant pour des protéines membranaires.

Le cluster DR1 est enrichi significativement en gènes codant pour des protéines de thylacoïdes, incluant des composants des photosystèmes, indiquant que le traitement par la galvestine-1 induit directement ou indirectement une répression de l'expression de gènes codant pour des protéines des membranes photosynthétiques que l'on peut probablement associer à l'interruption de la biogenèse des chloroplastes. L'expression de *VIPP1*, supposé jouer un rôle dans la formation des membranes thylacoïdiennes, n'est toutefois pas modifiée significativement. Le traitement en présence de galvestine-1 n'a pas eu d'impact important sur l'expression de *FAB2*, codant pour une stéaroyl-delta-9 désaturase (désaturation du C18 :0 en C18 :1). Par contre, le gène *ADSI*, codant pour une acyl-CoA delta-9 désaturase cytosolique, est quant-à lui réprimé, ce qui pourrait être une cause de l'augmentation de la teneur en C18:0 observée suite à un traitement en présence de l'inhibiteur, renforçant l'hypothèse que l'augmentation en C18:0 liée au traitement galvestine-1 peut être considéré comme une signature de glycérolipides générés à l'extérieur du plaste, *i.e.* par la voie eucaryotique. Considérant que le MGDG est une source de PUFAs pour la synthèse des oxylipines (Voir Partie Bibliographique) (Andreou et al., 2009), une part de la voie de synthèse des oxylipines pourrait être contrôlée au niveau transcriptionnel par le niveau de production du MGDG. En effet, les gènes codant pour deux enzymes majeures de cette voie, *LOX2* et *AOS*, sont

réprimés. Parmi les gènes particulièrement intéressants du cluster DR1, 22 gènes furent précédemment rapportés comme induits en réponse à une carence de Pi, tels que *PHO1;H1*, codant pour un transporteur de phosphate, *PHO81*, codant pour une protéine PHO1;H1-like, *SRG3* gène d'une glycérophosphoryldiester phosphodiesterase et enfin *SQD2*, codant pour la sulfolipide synthase de l'enveloppe plastidiale (voir Partie Bibliographique).

L'analyse des gènes dont l'expression est induite par le traitement en présence de galvestine-1 montre que le cluster UR1 plus spécifique des traitements courts comprend des gènes précédemment caractérisés pour répondre à des stress, incluant 13 gènes spécifiquement classifiés dans les réponses à des stimuli chimiques (GO:0042221). Ce cluster contient deux gènes *LTP* codant pour des protéines putatives de transport de lipides. Le cluster UR2 contient 35 gènes codant pour des protéines membranaires, incluant 22 protéines du système endomembranaire. Dans ce cluster, *PAP1*, codant pour une acide phosphatidique phosphatase de la membrane plasmique, *LPAP* codant pour une acide lysophosphatidique phosphatase vacuolaire, *ALAI*, codant pour une translocase d'aminophospholipides putative (ATPases de type P4) de la membrane plasmique (voir plus loin), et un troisième gène *LTP* indiquent qu'une reprogrammation de gènes impliqués dans le remodelage lipidique est possiblement provoquée par le traitement en présence d'inhibiteur. Le cluster UR3, correspondant à des gènes induits également et fortement dans toutes les conditions, incluse *ALAI0*, codant pour une autre translocase d'aminophospholipides putative, *LPAP2*, codant pour une lipide acyl hydrolase, *GTPR*, codant pour une protéine de transfert de glycolipides, et un quatrième gène *LTP*. De nombreux gènes jouant un rôle possible dans l'établissement et le contrôle de l'homéostasie lipidique sont ainsi mis en évidence, mais leur implication réelle reste encore à être déterminée.

D'autres analyses transcriptomiques réalisées à partir de plantes cultivées en carence de Pi ont également mis en évidence plusieurs gènes candidats liés au métabolisme lipidique (Misson et al., 2005; Morcuende et al., 2007). Comme indiqué précédemment (Partie Bibliographique), la carence de Pi utilisée comme moyen de perturber le système glycérolipidique a permis de progresser significativement dans la compréhension du métabolisme lipidique et dans l'identification de composants sollicités lorsque la plante est soumise à une carence de Pi. Citons par exemple plusieurs phospholipases C et D, *NPC4*, *NPC5*, d'une part, et *PLDζ1*, *PLDζ2*, d'autre part. Le croisement des données provenant des différentes analyses effectuées en présence de galvestine-1 et en carence de Pi, nous a conduit à nous focaliser sur certains gènes dont l'expression varie dans ces deux types de conditions.

Parmi ces gènes, nous nous sommes intéressés à *ALA10*, un gène fortement surexprimé en présence de galvestine-1 (Botte et al., 2011) et surexprimé en carence de Pi (Misson et al., 2005).

2. *ALA10*, gène codant pour une flippase putative, induit par la galvestine-1 et par la carence de phosphate.

La protéine ALA10 est une ATPase de type P4, ayant un rôle putatif de flippase, une activité responsable du mouvement de lipides polaires d'un feuillet à l'autre d'une bicouche. Il est en effet connu que la distribution des lipides polaires n'est pas symétrique au sein des deux feuillets qui composent les membranes biologiques (voir Partie Bibliographique) (Jouhet et al., 2007). Il a été montré que cette répartition asymétrique joue un rôle important dans plusieurs processus comme l'apoptose, la cytokinèse et les interactions de type hôte-pathogène (Devaux et al., 2008; Sebastian et al., 2012). Chez les plantes, plusieurs cas d'asymétrie membranaire ont été rapportés (Jouhet et al., 2007). La membrane plasmique présente une asymétrie avec de la PS composant majoritairement le feuillet cytosolique de la membrane. Au niveau de la membrane du tonoplaste, une légère asymétrie a été détectée avec de la PE composant principalement du feuillet cytosolique de la membrane. Dans les plastes limités par des deux membranes de l'enveloppe, la PC est présente uniquement dans la membrane externe, majoritairement au niveau du feuillet cytosolique. Dans les thylacoïdes, le feuillet externe a une proportion plus importante de MGDG et de PG, tandis que le feuillet interne est enrichi en DGDG et en SQDG. Cette asymétrie des membranes eucaryotes est maintenue entre autre par des ATPases de type P4 qui catalysent le transfert des lipides d'un feuillet à l'autre de la membrane en utilisant l'ATP comme source d'énergie (Paulusma and Elferink, 2010) (voir Partie Bibliographique).

L'alignement de la séquence protéique d'ALA10 montre une homologie avec des flippases de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, Drs2p, Dnf1p, Dnf2p, Dnf3p et Neolp (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) (Paulusma and Elferink, 2010) (voir Partie Bibliographique). De plus, plusieurs résidus conférant une spécificité d'interaction à la PC, dans la séquence protéique de DNF1p (Baldrige and Graham, 2013), sont retrouvés dans la séquence protéique d'ALA10 suggérant qu'ALA10 pourrait avoir une spécificité pour la PC.

Chez *Arabidopsis thaliana*, la flippase putative ALA10 fait partie d'une famille multigénique d'ATPases de type P4 comportant 12 membres nommés ALA1 à ALA12 (Gomes et al., 2000). Dans cette famille, le gène *ALA10* est surexprimé à la fois en carence de Pi (Misson et al., 2005) et après un traitement par la galvestine-1 (Botte et al., 2011). L'expression des gènes *ALA1* et *ALA11* est également accrue dans ces conditions mais dans une bien moindre mesure. Par ailleurs, l'étude comparée de profils transcriptomiques de gènes d'*Arabidopsis* dans des conditions physiologiques et environnementales variables montrent qu'*ALA10* présente une forte corrélation d'expression avec *PLDγ1* (<http://atted.jp/>) et nous avons effectivement observé que *PLDγ1* est sur-exprimé lors du traitement par la galvestine-1 et lors de la carence en Pi (Botte et al., 2011). Comme il a été montré que *PLDγ1* est impliquée dans la modulation des lipides membranaires en condition de stress à l'aluminium (Zhao et al., 2011) et que l'AP est un activateur des MGDG synthases (Dubots et al., 2012), nous avons émis l'hypothèse que ALA10 pourrait être impliquée dans la modulation des lipides membranaires induites en présence de la galvestine-1, éventuellement en relation avec *PLDγ1*.

Dans ce chapitre, j'ai vérifié l'effet du traitement galvestine-1 sur l'expression d'ALA10, puis j'ai analysé le lien possible entre l'expression d'*ALA10* et la synthèse des galactolipides. L'analyse de l'influence de l'expression d'*ALA10* sur l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des galactolipides est d'abord décrite. La caractérisation des phénotypes liés à l'expression d'*ALA10* en lien avec le traitement galvestine-1 est ensuite détaillée.

II. Caractérisation génomique des lignées mutantes et des constructions utilisés pour l'étude de la flippase putative ALA10 (AT3G25610)

Plusieurs lignées différant dans le niveau d'expression de la protéine ALA10 ont été utilisées pour nos travaux, une lignée mutante KO par insertion d'étiquette dans le gène *ALA10*, appelée ici *ala10* et deux lignées de sur-expression, appelées ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2, exprimées sous le contrôle du promoteur CaMV 35S.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que chacune de ces lignées présentait bien le profil attendu pour l'expression d'*ALA10*.

1. Génotypage et analyse de l'expression d'*ALA10* dans la lignée *ala10* (SALK_024877C)

En absence de recombinaison homologue chez les plantes, l'inactivation de gène chez *Arabidopsis* ne peut être ciblée. La construction et la mutualisation par des consortiums internationaux (INRA Versailles, France ; Salk Institute, USA ; GABI, Allemagne) de collections de mutants d'insertion, à l'aide de cassettes s'insérant au hasard dans le génome, et leur cartographie systématique, rendent cependant possible l'accès à des mutants pour un gène d'intérêt. J'ai bénéficié pour ce travail de la disponibilité au laboratoire d'une lignée provenant du Salk Institute, SALK_024877C, pour laquelle la cartographie de l'étiquette d'insertion avait prédit une interruption du gène d'*ALA10*. Cette lignée a été purifiée par 3 croisements en retour avec la lignée parente WT *Col-0*, puis autofécondation et génotypage jusqu'à obtention de lignées homozygotes pour l'insertion.

La vérification de l'insertion de l'étiquette ADN-T dans le gène *ALA10* a été effectuée par PCR, à l'aide d'un jeu de 3 amorces (Figure C2 1). Cette combinaison d'amorces permet d'amplifier spécifiquement l'allèle sauvage ou l'allèle muté du gène d'intérêt. L'amorce située à l'extrémité gauche de l'étiquette de l'ADN-T (LB) est sélectionnée suivant les instructions du SALK Institute. Cette amorce est utilisée de paire avec une autre amorce, localisée dans le gène *ALA10*, appelée ALA10Rv. ALA10Fw est la dernière amorce. Le couple ALA10Fw/ALA10Rv (amorces détaillées dans la Figure C2 1, A et C) encadre le gène *ALA10* (Figure C2 1, B puits 1). Comme attendu, aucune amplification n'a pu être obtenue sur la lignée *ala10* contrairement au sauvage (Figure C2 1, B puits 1 et 3). De plus, l'amplification de l'étiquette T-DNA sur la lignée *ala10* (Figure C2 1, B puits 2 et 4) confirmée par le séquençage de l'amplicon (non montré) atteste l'insertion de l'étiquette sur *ALA10*. Au global, l'analyse par PCR de génotypage confirme donc que la lignée mutante *ala10* choisie est bien homozygote pour l'insertion dans *ALA10*.

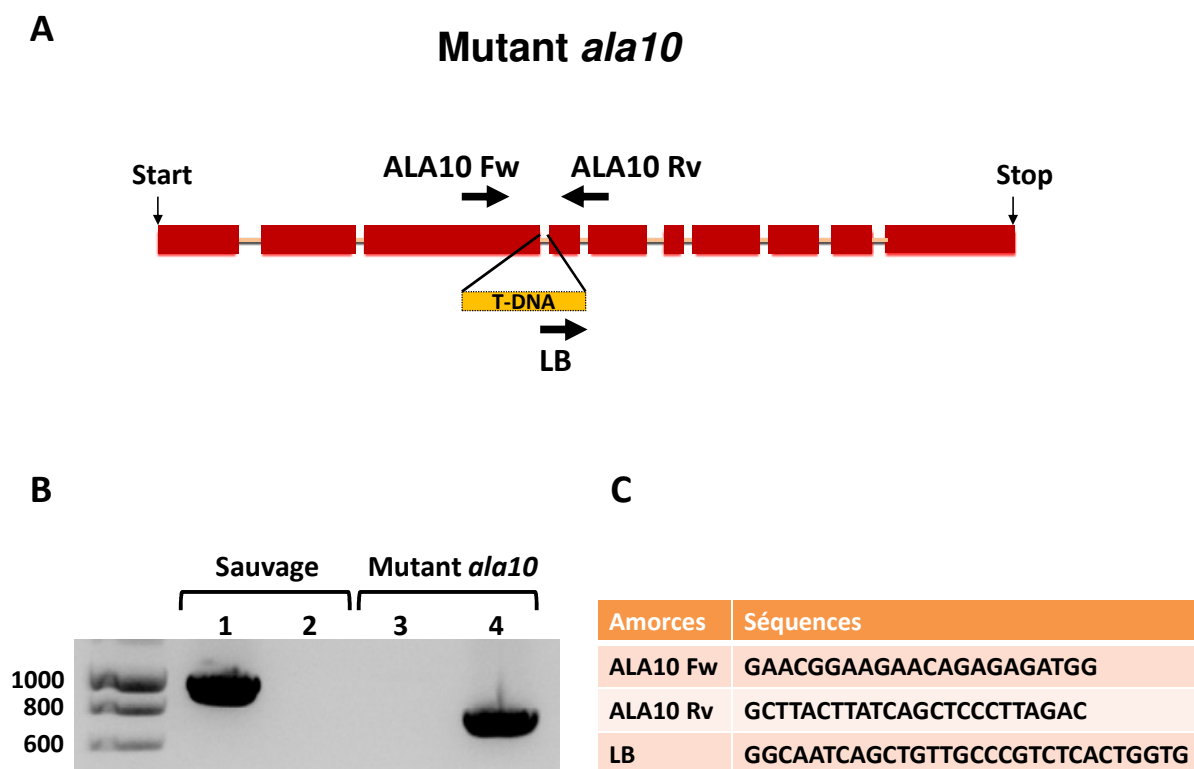


Figure C2 1 Génotypage de la lignée SALK_024877C (*ala10*). **A)** Cartographie de l'insertion d'un T-DNA dans le gène *ALA10* (At3G25610) dans la lignée SALK_024877C. Le début et la fin du gène sont indiqués par les flèches « start » et « stop » respectivement. Les rectangles rouges représentent les exons, le rectangle jaune représente le T-DNA et les lignes roses, les introns. Les positions des amorces utilisées pour la PCR (ALA10Fw, ALA10Rv et LB) sont indiquées par des flèches. **B)** Confirmation de la perte d'expression du gène *ALA10* par PCR dans le mutant *ala10*. Les puits 1 et 3 représentent l'amplification d'*ALA10* due au couple ALA10Fv/ALA10Rv et les puits 2 et 4 représentent l'amplification de l'étiquette T-DNA due au couple LB/ALA10Fv. **C)** Tableau des amorces utilisées pour la PCR.

Dans un second temps, pour contrôler l'expression d'*ALA10* dans *ala10*, une analyse de l'expression d'ARNm d'*ALA10* a été effectuée par RT-PCR quantitative sur des plantules contrôles (WT) et des plantules de la lignée *ala10* au moyen d'amorces situées de part et d'autre de l'insertion (couple *ala10* Fw/*ala10* Rv) encadrant un fragment du gène *ALA10* d'environ 200 pb. (Figure C2 2, A, amorces détaillées dans le Matériel et Méthodes IV.2.d). Les résultats indiquent que la lignée *ala10* n'exprime pas l'ARNm complet correspondant au gène *ALA10*. Par immunodétection de type « Western blot », nous avons ensuite vérifié que la protéine *ALA10* était bien absente.

Un sérum contenant des anticorps anti-*ALA10* est disponible au laboratoire. Il a été obtenu par immunisation de 2 lapins avec le peptide C-terminal de *ALA10* (la séquence des 16 derniers acides aminés d'*ALA10* –seule séquence spécifique d'*ALA10* par rapport aux

autres ALA- couplée par une cystéine en C-terminal de l'ovalbumine) suivi d'une purification par affinité sur le peptide. Utilisé en immunodétection sur des protéines de la lignée *Col-0* sauvage, ce sérum doit être utilisé fortement concentré pour permettre la détection de protéines de taille attendue pour ALA10 (136kDa) et donne alors un fort bruit de fond. Nous avons donc procédé à l'immunodétection en 2 étapes : un épuisement du sérum sur un blot contenant une forte concentration de protéines de la lignée *ala10* puis, avec ce sérum épuisé, une immunodétection sur des protéines des différentes lignées comparées à la lignée sauvage. L'absence de la protéine ALA10 a ainsi pu être confirmée sur la lignée *ala10* (réalisé par Catherine Albrieux) (Figure C2 2, C). L'ensemble de ces informations nous indiquent que la lignée *ala10* contient une insertion dans le gène ALA10, provoquant une interruption de ce gène et une déplétion totale en protéine ALA10. Cette lignée peut donc être utilisée comme contrôle négatif pour vérifier l'effet de la galvestine-1 sur l'expression de *ALA10* dans la lignée sauvage.

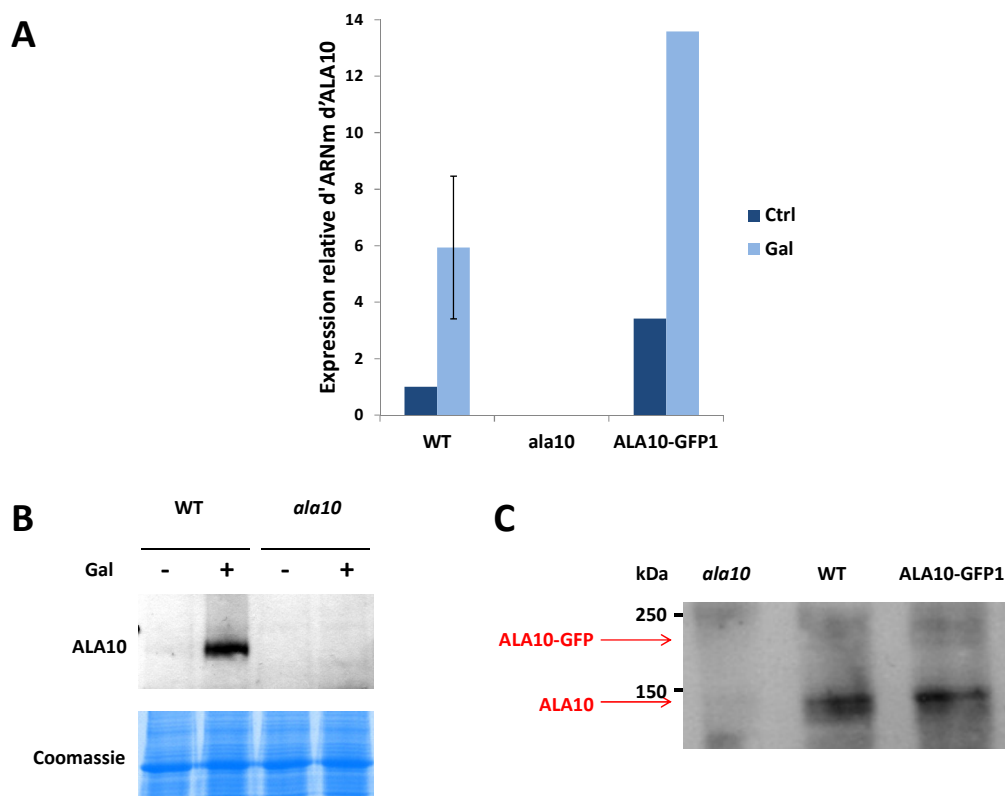


Figure C2 2 : Expression relative d'ALA10 dans le WT, la lignée *ala10* (SALK_024877C) et la lignée transformée ALA10-GFP1. Des plantules sauvages (WT), du mutant *ala10* et de la lignée transformée ALA10-GFP1 ont été cultivées sur milieu gélosé en conditions standard ou en présence de galvestine-1 à 250 μ M pendant 15 jours. **A) Quantification par RT-PCR quantitative de l'expression du gène ALA10 chez le WT, le mutant *ala10* et la lignée transformée ALA10-GFP1.** Une extraction d'ARNm a été réalisée à partir de feuilles des rosettes WT, du mutant *ala10* et de la lignée transformée ALA10-GFP1. L'expression du gène ALA10 a été quantifiée par RT-PCR. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs de 5 expériences indépendantes normalisées par rapport aux valeurs du WT cultivé en condition standard ($n = 5$) pour le WT et le mutant *ala10*. Les barres d'erreurs représentent les SEM (standard error of the mean). Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs d'une expérience normalisée par rapport aux valeurs du WT cultivé en condition standard ($n = 1$) pour la lignée transformée ALA10-GFP1. **C) Immunodétection par Western Blot de la protéine ALA10 à partir de feuilles d'*Arabidopsis*.** Des plantules WT et du mutant *ala10* ont été cultivées sur milieu gélosé, complété avec de la galvestine-1 à 250 μ M (+) ou sans additif (-) pendant 15 jours. Les feuilles des rosettes ont ensuite été récoltées, puis une extraction protéique a été réalisée. La protéine ALA10 est ensuite immunodéctée par un anticorps polyclonal spécifique anti-ALA10 (sérum préalablement incubé en présence de protéines du mutant *ala10*, afin de réduire les réactions croisées non spécifiques et dilué au 200ème). Les plantules WT présentent une teneur en ALA10 (136 kDa) plus élevée en présence de galvestine-1 (+) comparé à la condition contrôle (-). Aucune expression d'ALA10 n'est détectée dans le mutant *ala10*. **D) Immunodétection par Western Blot d'ALA10 et de la fusion ALA10-GFP dans des extraits protéiques de feuilles d'*Arabidopsis*.** Des plantules WT, du mutant *ala10* et de la lignée transformée ALA10-GFP1 ont été cultivées sur milieu gélosé en conditions standard pendant 15 jours. Les feuilles des plantules ont ensuite été récoltées puis une extraction protéique a été réalisée. La protéine ALA10 (136 kDa) et la protéine chimérique ALA10-GFP (136 + 27 = 163 kDa) sont ensuite immunodéctées par un anticorps anti-ALA10. Les anticorps reconnaissent dans la zone de 136 kDa un signal dans les plantules WT et transformées ALA10-GFP1 absent dans *ala10*. Dans les plantules ALA10-GFP1, un faible signal supplémentaire apparaît dans la zone de 163 kDa qui pourrait correspondre à ALA10-GFP.

2. Obtention des lignées ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2 et analyse de leur niveau d'expression d'ALA10

Des lignées ont été construites au laboratoire pour exprimer la fusion d'ALA10 avec la protéine fluorescente GFP dans un fond génétique Col-0 sous le contrôle du promoteur CaMV 35S et du terminateur nopalamine synthase *nos*.

La séquence codante complète d'ALA10 fusionnée au niveau C terminale avec la séquence de la GFP a été introduite par transformation florale à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens* en parallèle d'une cassette de résistance à la kanamycine. Par sélection sur kanamycine, 2 lignées indépendantes ont été sélectionnées : ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2. Par observation confocale, il a été constaté que le signal GFP était détectable dans les 2 lignées. Ce signal était très faible dans la lignée ALA10-GFP1 mais fort dans ALA10-GFP2 (travail de M2 Emeline Sautron). Malgré un niveau de signal GFP faible, la lignée ALA10-GFP1 a été sélectionnée pour la suite du travail car la lignée présentait une descendance homogène pour la résistance à la kanamycine, par contraste avec ALA10-GFP2.

Une analyse par RT-PCR quantitative de l'expression d'ARNm d'*ALA10* a été effectuée sur des plantules de la lignée transformée ALA10-GFP1 (Figure C2 2, B). Les résultats indiquent que les plantes ALA10-GFP1 présentent un niveau d'ARNm correspondant à la région codante d'*ALA10* plus élevé comparé au WT. Enfin, la présence de la protéine ALA10 a pu être confirmée par immunodétection à partir de feuilles de rosettes de la lignée ALA10-GFP1 (réalisé par Emeline Sautron) (Figure C2 2, D). Nous avons détecté un niveau similaire de protéine ALA10 dans la lignée ALA10-GFP1 comparé au WT. En ce qui concerne la protéine chimérique ALA10-GFP correspondant à un poids moléculaire attendu de 163 kDa, nous avons détecté un très faible signal seulement, ce qui pourrait indiquer que la protéine chimérique complète n'est présente qu'en faible quantité. L'ensemble de ces résultats confirme que la lignée transformée ALA10-GFP1 conduit à une surexpression de la région codante du gène *ALA10*.

3. Analyse du niveau d'expression de ALA10 dans des feuilles de plantules cultivées en présence de Galvestine-1

Lorsque les plantules WT sont traitées en présence de galvestine-1 à 250 μ M pendant 15 j, une augmentation de l'expression du gène *ALA10* relativement conséquente est visible par RT-PCR quantitative dans les feuilles (Figure C2 2, A). En contrôle négatif, comme nous l'avons vu plus haut, aucun signal d'expression *ALA10* n'est détecté dans la lignée *ala10*. Dans la lignée ALA10-GFP1, le traitement par la galvestine-1 provoque une augmentation de l'expression de *ALA10* comparable à celle observée dans le WT (Figure C2 2, B). Cependant les mesures ont été effectuées sur un seul échantillon de plantes ALA10-GFP1 et nécessiteraient une mesure de répliquats.

Par immunodétection, nous avons observé dans des extraits protéiques de feuilles de plantules WT, cultivées en présence de galvestine-1 à 250 μ M, un signal correspondant à la protéine ALA10 beaucoup plus fort que dans les WT témoins non traités (Figure C2 2, C).

En conclusion, ces données confirment les résultats antérieurs obtenus lors de l'analyse transcriptomique (Botte et al., 2011) à savoir une augmentation de l'expression d'*ALA10* suite à un traitement par la galvestine-1. Ils indiquent aussi que cette augmentation de l'expression est suivie par une augmentation de la teneur en protéine ALA10.

III. Relation entre l'expression d'*ALA10* et la synthèse des galactolipides

1. Effet de la galvestine-1 sur l'expression de gènes liés à la synthèse des galactolipides dans le WT

Tout d'abord nous avons observé l'effet de la galvestine-1 sur l'expression des gènes *MGD1*, *MGD2*, *MGD3*, *DGD1* et *DGD2* qui sont impliqués dans la synthèse des galactolipides (voir Partie Bibliographique). Ces gènes avaient déjà été analysés dans des travaux antérieurs en présence de galvestine-1 diluée dans du DMSO (connu par ailleurs pour

avoir un effet stimulateur des phospholipases D (Clejan et al., 1996), et n'ayant donc pas nécessairement la propriété de "véhicule" neutre qu'on attend pour un solvant de petites molécules), et nous souhaitions évaluer ces variations avec une solubilisation de la galvestine-1 dans du Tween-20. Nous avons par ailleurs analysé *PLD γ* , gène connu pour être co-exprimé avec *ALA10*, et induit par le traitement en présence de galvestine-1. Une extraction d'ARNm a été réalisée sur des plantules sauvages WT cultivées en absence ou en présence de galvestine-1 à 250 μ M et l'expression des différents gènes a été quantifiée par RT-PCR quantitative. L'analyse par RT-PCR quantitative confirme ainsi, en présence de galvestine-1, une augmentation significative de *PLD γ* (noté PLDg1) (Figure C2 3) proche de l'augmentation observée pour l'expression d'*ALA10* (Figure C2 3). D'autre part, une diminution significative du niveau d'expression de *MGD3* est observée en présence de galvestine-1 (Figure C2 3). Le traitement n'a pas d'effet significatif sur le niveau d'expression de *MGD1*, de *MGD2* (effet très variable ici) et des gènes *DGD1* et *DGD2*.

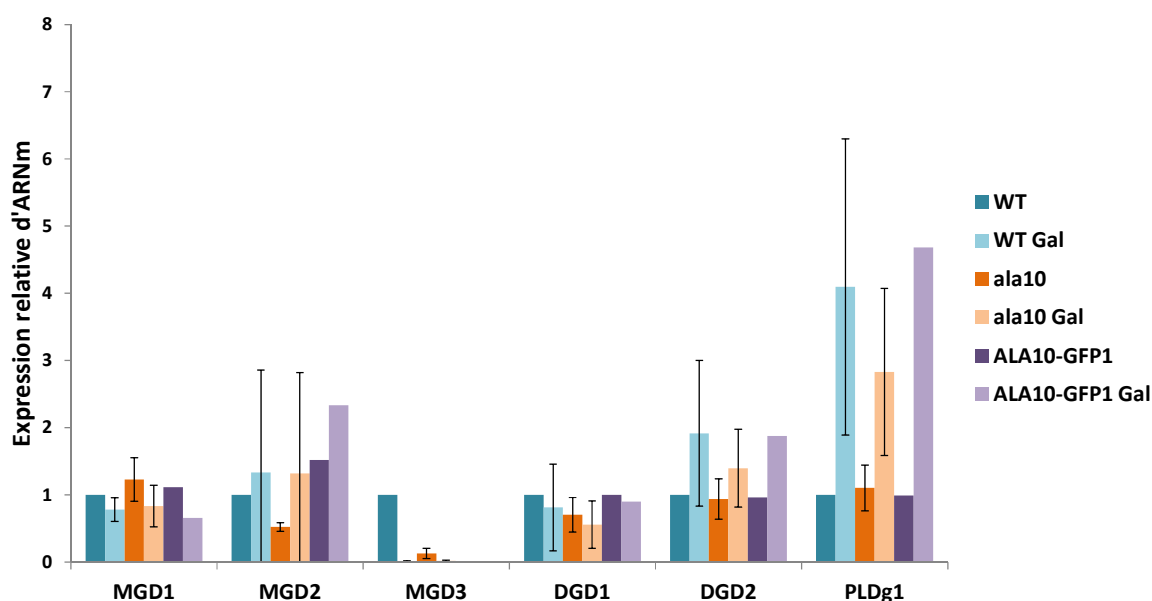


Figure C2 3 Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression de gènes liés à la synthèse des galactolipides ainsi que du gène *PLD γ* chez le WT, le mutant *ala10* et la lignée transformée ALA10-GFP1. Des plantules WT, du mutant *ala10* et de la lignée transformée ALA10-GFP1 ont été cultivées sur milieu gélosé en conditions standard ou en présence de galvestine-1 à 250 μ M pendant 15 jours. Une extraction d'ARNm a été réalisée à partir des feuilles des plantules WT, du mutant *ala10* et de la lignée transformée ALA10-GFP1. Une quantification de l'expression des gènes a ensuite été effectuée par RT-PCR quantitative. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs de 5 expériences indépendantes normalisées par rapport aux valeurs du WT cultivé en condition standard (n = 5). Les barres d'erreurs représentent les SEM (standard error of the mean). Une seule expérience a été réalisée pour la lignée ALA10-GFP1.

2. Impact possible du niveau d'expression d'*ALA10* sur des gènes liés à la synthèse des galactolipides

En condition standard sans galvestine-1, l'analyse par RT-PCR quantitative du mutant *ala10* comparé au WT indique que le niveau d'expression des gènes *MGD2* et de *MGD3* est plus faible dans *ala10* alors que le niveau d'expression des autres gènes n'est pas significativement affecté (Figure C2 3). L'absence d'expression du gène *ALA10* induirait donc une diminution de l'expression de gènes *MGD2* et *MGD3*. Ceci suggère que l'expression d'*ALA10* jouerait un rôle favorable sur l'expression de *MGD2* et de *MGD3*. Cette conclusion semble en partie confirmée par l'unique analyse (à confirmer) réalisée sur les plantules *ALA10*-GFP1 sur-exprimant *ALA10* où un niveau d'expression de *MGD2* plus élevé est observé dans *ALA10*-GFP1 comparé au WT (Figure C2 3). Au global, ceci nous suggère une relation entre *ALA10* et l'expression de certains gènes de synthèse du MGDG. La présence de galvestine-1 pourrait induire en retour une augmentation de l'expression d'*ALA10* permettant de renforcer la machinerie de synthèse des galactolipides. Dans ce cas la traitement galvestine-1 devrait entraîner spécifiquement des réponses d'expression des *MGD2* et *MGD3* différentes dans les différentes lignées d'*ALA10*.

Le traitement par la galvestine-1 semble affecter le profil d'expression des gènes *MGD1*, *DGD1*, *DGD2*, *PLD γ 1* de manière relativement comparable dans le mutant *ala10*, dans *ALA10*-GFP1 et dans le WT (Figure C2 3). En ce qui concerne *MGD2* et *MGD3*, la mesure de leur niveau d'expression est trop imprécise pour conclure de manière formelle si la variation du niveau d'*ALA10* modifie l'expression de ces gènes en réponse au traitement galvestine-1 (Figure C2 3). Nous avons donc cherché à aborder cette question d'une manière plus générale, à savoir en analysant l'effet du traitement galvestine-1 sur la croissance des plantes de lignées comportant des niveaux différents d'*ALA10*.

IV. Effet du traitement par la galvestine-1 sur la croissance des lignées *ala10* et ALA10-GFP

1. Croissance et aspect de la rosette des plantules des lignées *ala10* et ALA10-GFP en présence de galvestine-1

Des plantules du WT, du mutant *ala10*, ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2 ont été cultivées dans les conditions établies pour le criblage (voir chapitre 1) permettant d'observer une sensibilité à la galvestine-1.

Chez le WT, les feuilles chlorotiques sont visibles dès 25 μ M, tout comme chez *ala10* (Figure C2 4). Les plantes transformées ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2 sur-exprimant la région codante d'ALA10, présentent des feuilles vertes jusqu'à 100 μ M (Figure C2 4). Cette étude comparée suggère que les plantes transformées ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2 présentent une résistance partielle à la galvestine-1. Il est en effet important de noter que dans tous les cas les plantes sont affectées par le traitement. Ces informations nous suggèrent que la sur-expression d'ALA10 augmente la tolérance à la galvestine-1.

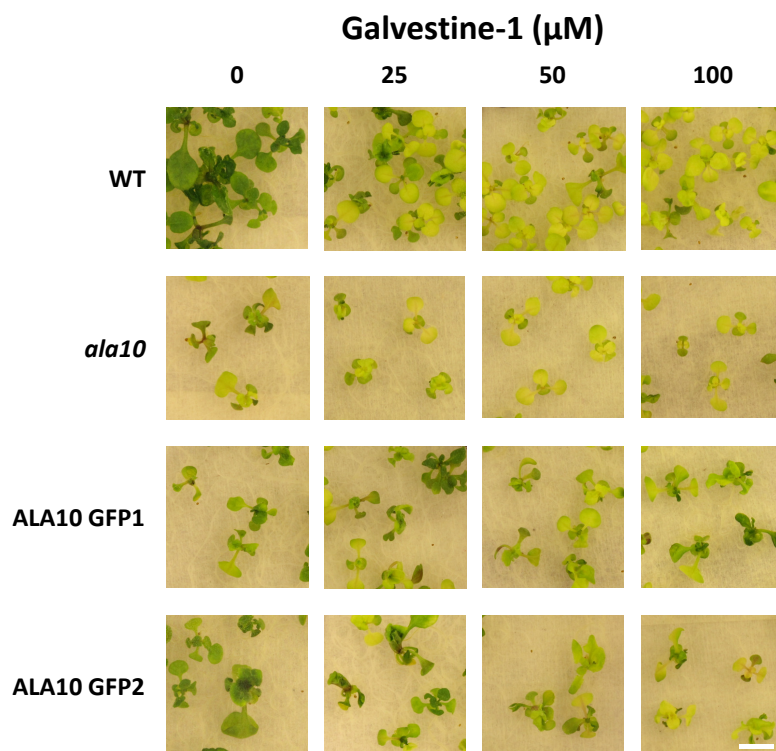


Figure C2 4: Comparaison de la croissance de plantes sauvages, du mutant *ala10* et de lignées transformées ALA10-GFP en présence de doses croissantes de galvestine-1. Des graines du WT, du mutant *ala10*, de lignées transformées ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2 ont été stérilisées et ensemencées sur milieu Murashige et Skoog gélosé complété avec du saccharose 2% et avec différentes concentration de galvestine-1 (0, 25, 50 et 100 μM) diluée dans du Tween-20 0,2%. Après stratification à 4°C pendant 2 jours dans l'obscurité, les plants ont été transférés en chambre de culture en cycle long, gardés à l'obscurité durant 3 jours, puis placées à la lumière pour être observées sur une période de 22 jours. Chez le WT et le mutant *ala10*, un seuil de sensibilité à la galvestine-1 est visible à partir de 25 μM , avec des nouvelles feuilles chlorotiques. Les plantes transformées ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2 montrent une résistance partielle à la galvestine-1 avec la présence de feuilles vertes à 100 μM . Barre d'échelle : 0,5 cm

2. Développement racinaire de la lignée *ala10* et des lignées ALA10-GFP en présence de galvestine-1

Un des effets principaux du traitement par la galvestine-1 est la réduction de la longueur de la racine chez la plante sauvage (Botte et al., 2011). Des plantules du WT, du mutant *ala10*, des lignées ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2 ont été cultivées à la verticale afin d'observer la différence de tailles des racines à des concentrations croissantes de galvestine-1 (0, 10 et 20 μM). Les plantules ont été cultivées 4 jours à l'horizontale afin que la racine pénètre en profondeur dans le milieu gélosé et soit au maximum en contact avec la galvestine-1. Les plantules ont ensuite été placées en position verticale (T0) et observées après 3 et 9 jours, T3 (Figure C2 5, A) et T9 (Figure C2 5, B) respectivement. Les résultats indiquent qu'à

T3, chez le WT, plus la concentration de galvestine-1 est élevée, plus la racine est courte (Figure C2 5, A).

Dans la condition contrôle (0 μ M), le mutant *ala10* ne présente pas de différence au niveau de la longueur de la racine comparé au WT. A 10 et 20 μ M, la racine du mutant *ala10* est plus courte comparée au WT, ce qui suggère une sensibilité plus grande à la galvestine-1 chez ce mutant. A T9, aucune différence n'est visible au niveau de la longueur de la racine entre le WT et le mutant *ala10* sur les différentes concentrations de galvestine-1 (Figure C2 5, B).

A T9, les racines des plantules transformées ALA10-GFP1 sont plus longues que celle du WT, ceci à toutes les concentrations de galvestine-1 (Figure C2 5, B), suggérant une diminution de la sensibilité à la galvestine-1, comparée à celles du WT et du mutant *ala10*. Les racines des plantules transformées ALA10-GFP2 sont également plus longues que celles du WT (Figure C2 5, B). La taille de la racine est supérieure à celle des plantules transformées ALA10-GFP1 jusqu'à 10 μ M. Une diminution de la taille de la racine des plantules transformées ALA10-GFP2 n'est observée à 20 μ M, cette diminution restant inférieure à celle observée sur le WT.

Ensemble, ces analyses suggèrent que les lignées transformées ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2 sont moins sensibles à la galvestine-1, comparées au WT et au mutant *ala10*. Par ailleurs, d'après les résultats obtenus sur ce test de développement racinaire, le mutant *ala10* semble plus sensible à la galvestine-1 dans les premiers temps de croissance (T3, Figure C2 5, A) comparé au WT. La surexpression d'ALA10 semble quant à elle favoriser la croissance de la racine et conférer une tolérance partielle à la galvestine-1. Ces résultats sont globalement cohérents avec l'étude de croissance présentée plus haut.

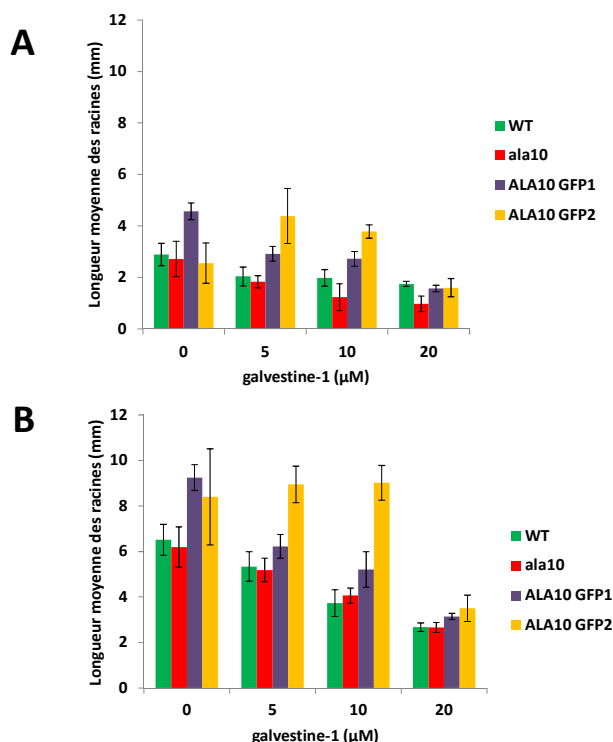


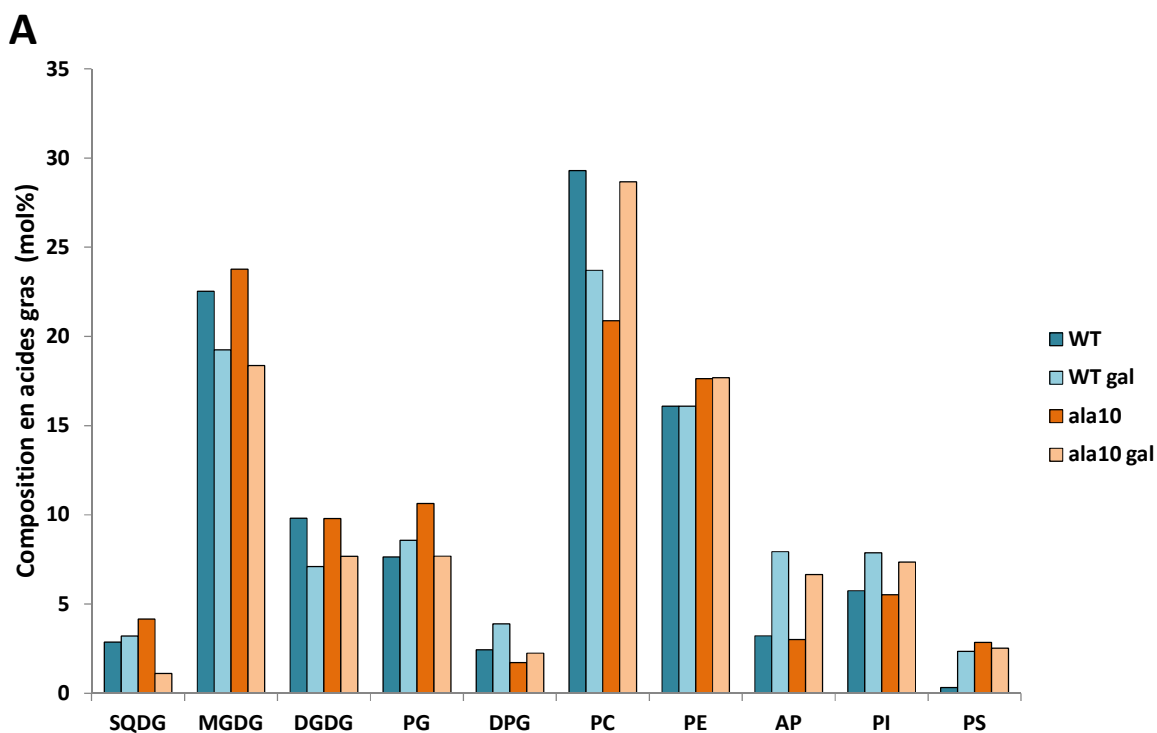
Figure C2 5 Comparaison du développement racinaire de plantes sauvages, du mutant *ala10*, et de lignées transformées ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2 en présence de doses croissantes de galvestine-1. Des graines du WT, du mutant *ala10*, des lignées ALA10-GFP1 et d'ALA10-GFP2 ont été stérilisées et ensemencées sur milieu Murashige et Skoog gélosé complété avec différentes concentrations de galvestine-1 (0, 5, 10, et 20 µM) diluée dans du DMSO 1%. Après stratification à 4°C pendant 2 jours à l'obscurité, les plants ont été transférés en chambre de culture en cycle long, placés à l'horizontale pendant 4 jours puis en position verticale (T0) pour être observés sur une période de 7 jours (T3) et 13 jours (T9). **A) Longueur moyenne des racines du WT, du mutant *ala10*, des lignées transformées ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2 en fonction de la concentration de galvestine-1 à T3.** Le WT et le mutant *ala10* présentent une longueur de la racine inversement corrélée à la concentration de galvestine-1. Les plantules transformées ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2 présentent une racine significativement plus longue que celle du WT. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs d'une expérience normalisées par rapport aux valeurs du WT cultivé en condition standard et les barres d'erreurs représentent les SEM (standard error of the mean). **B) Longueur moyenne des racines du WT, du mutant *ala10*, des lignées transformées ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2 en fonction de la concentration de galvestine-1 à T9.** Le WT et le mutant *ala10* présentent une longueur de la racine inversement corrélée à la concentration de galvestine-1. Les plantules transformées ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2 présentent une racine significativement plus longue que celle du WT. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs d'une expérience normalisées par rapport aux valeurs du WT cultivé en condition standard et les barres d'erreurs représentent les SEM (standard error of the mean).

V. Influence de l'expression d'ALA10 sur le profil glycérolipidique chez *Arabidopsis*

Le profil glycérolipidomique a été déterminé, comme indiqué dans le Matériel et Méthodes, à partir d'extraits de feuilles de rosettes du mutant *ala10* et de plants sauvages, WT, cultivés en absence ou en présence de galvestine-1, 250 µM (Figure C2 6). Cette étude

n'a été réalisée qu'une fois, et devra être répliquée. L'analyse du profil des différentes classes lipidiques montre une différence importante au niveau de la PC et de la PS. Cependant ces 2 lipides étant très proches sur la chromatographie, il est difficile sur une seule expérience de pouvoir indiquer leurs proportions respectives. En les regroupant sous une seule classe (PC+PS), il semble qu'il n'y ait pas de différences, en conditions contrôle, entre le WT et le mutant *ala10* (Figure C2 6, A). En présence de galvestine-1, le mutant *ala10* montre des variations similaires à celles du WT. L'absence d'expression d'ALA10 ne semble donc pas avoir d'influence sur la proportion des différentes classes lipidiques, notamment au niveau des galactolipides MGDG et DGDG.

L'analyse du profil des acides gras dans les extraits lipidiques totaux de feuilles du mutant *ala10* et du WT ne présente pas de différences significatives (Figure C2 6, B). L'absence d'expression d'ALA10 ne semble donc pas avoir d'influence sur la composition en acides gras.



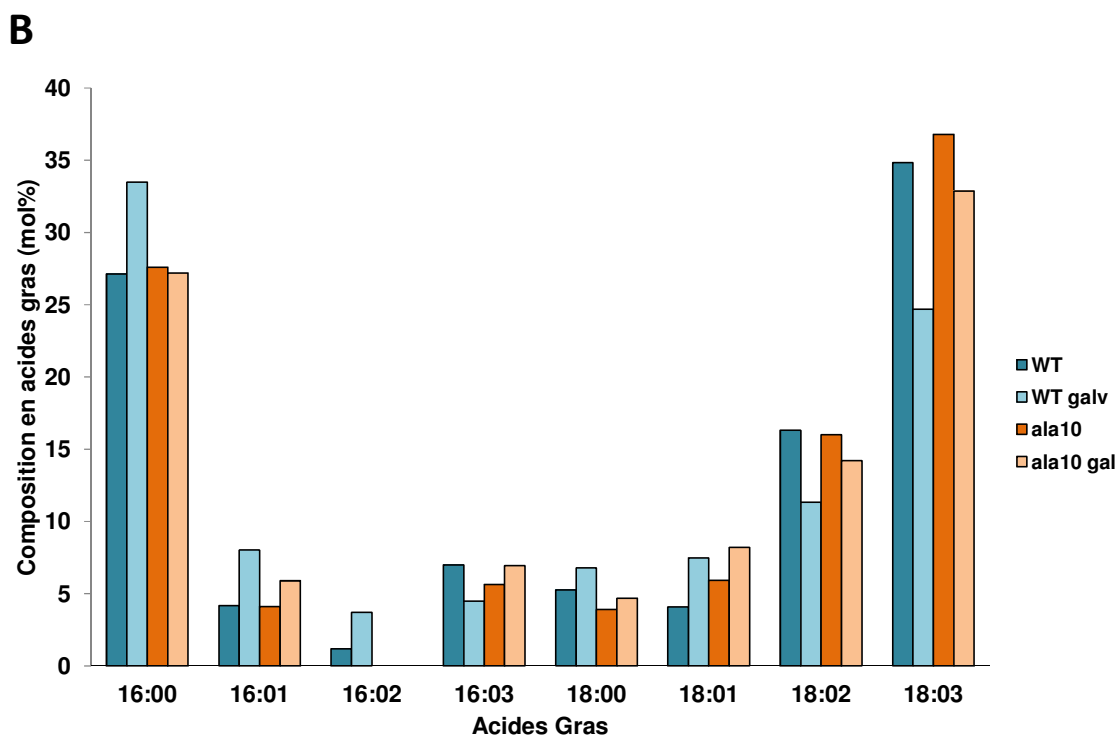


Figure C2 6. Comparaison des profils glycérolipidiques de rosettes de plants sauvages et du mutant *ala10* traités en présence de galvestine-1. Des plantules sauvages, WT, et du mutant *ala10* ont été cultivées sur milieu Murashige et Skoog gélosé complété avec de la galvestine-1 à 250 μ M diluée dans du Tween-20 0,2% (galv) ou sur un milieu contrôle de même composition sans galvestine-1 (Ctrl). Après 15 jours de croissance, les plantules ont été récoltées et congelées dans de l'azote liquide pour réaliser une extraction lipidique. Les lipides ont été extraits et séparés par chromatographie sur couche mince en 2 dimensions, comme décrit dans le Matériel et Méthodes. **A) Analyse des classes glycérolipidiques.** Chaque classe de glycérolipide a été quantifiée par chromatographie en phase gazeuse et détection par ionisation de flamme des acides gras méthylés, libérés après méthanolyse (voir Matériel et Méthodes). Les histogrammes représentent la valeur d'une expérience et la composition en lipide est exprimée en fonction du pourcentage de lipides totaux. **B) Analyse des acides gras totaux.** Les histogrammes représentent la valeur d'une expérience et la composition en lipide est exprimée en fonction du pourcentage de lipides totaux.

VI. Discussion

L'étude du gène candidat *ALA10* a permis de montrer un lien possible entre *ALA10* et la synthèse des galactolipides. En effet, les analyses par RT-PCR quantitatives suggèrent que l'expression du gène *ALA10* est vraisemblablement corrélée à celle des gènes *MGD2* et *MGD3* (Figure C2 3). D'une part, l'inactivation d'*ALA10* conduit à une chute de l'expression de ces gènes. D'autre part, l'augmentation de l'expression du gène *ALA10* s'accompagne une augmentation de l'expression du gène *MGD2* (Figure C2 3). L'analyse plus précise de l'expression de *MGD3* dans les différentes lignées devrait permettre de déterminer si un effet semblable est observé pour *MGD3*. Ces résultats devront être confirmés dans la lignée *ALA10*-GFP2. Les gènes *MGD2* et *MGD3* codent pour les MGDG synthases

correspondantes, qui participent à la synthèse du MGDG dans la membrane externe de l'enveloppe des plastes. Il a été rapporté que ces deux protéines étaient exprimées dans des tissus non chlorophylliens, tels que les racines, et qu'ils répondaient à des conditions de stress tels que la carence de phosphate (Awai et al., 2001). De façon cohérente, la comparaison du développement racinaire de plantules WT, du mutant *ala10* et des lignées ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2, en présence de galvestine-1 suggère que l'expression d'ALA10 pourrait aussi être corrélée à la longueur des racines (Figure C2 5, A et B). La surexpression d'ALA10 conférerait dans ce cas un phénotype résistant partiel à la galvestine-1. La galvestine-1 induisant une augmentation de l'expression du gène *ALA10* (Figure C2 2, A et B), et la surexpression d'ALA10-GFP conduisant à une augmentation de l'expression de *MGD2* et *MGD3*, un rôle possible d'ALA10 serait d'agir en amont de la production de MGDG. La galvestine-1 stimulant la voie eucaryotique extraplastidiale (Botte et al., 2011), il est envisageable qu'ALA10 soit une flippase jouant un rôle dans cette alimentation du chloroplaste en substrats glycérolipidiques. Il est à noter que l'analyse préliminaire du profil lipidique du mutant *ala10* ne présente pas de différence significative avec le WT, que ce soit en présence ou en absence de galvestine-1. Cette étude devra être confirmée et le profil lipidique des lignées ALA10-GFP devra être également étudié. Nous pouvons cependant déduire de cette observation que chez le sauvage, bien que l'expression d'*ALA10* soit induite par le traitement de l'inhibiteur, cette réponse ne parvient cependant pas atteindre assez rapidement le niveau nécessaire pour provoquer la résistance partielle que nous observons chez les sur-expressseurs.

Considérant que l'ensemble des analyses présentées ici soutiennent la position d'ALA10 en amont de la synthèse des galactoglycérolipides, vraisemblablement dans la voie eucaryote, et que ce rôle soit contrôlé transcriptionnellement, comment pouvons nous placer ce composant dans le schéma glycérolipidique général? Des études sont menées actuellement au laboratoire pour évaluer la possibilité qu'ALA10 complémente le phénotype de *Saccharomyces cerevisiae* délété de la flippase Drs2p (collaboration avec Patrice Catty, Chimie et Biologie des Métaux, CBM, CEA Grenoble), ce qui confirmerait la fonction de flippase d'ALA10. L'alignement de la séquence protéique d'ALA10 avec les flippases de la levure montre qu'ALA10 contient plusieurs résidus communs à Dnf1p (Paulusma and Elferink, 2010), tels que la Y618 et la F au niveau de la boucle exofaciale entre TM3 et TM4 qui joue un rôle dans l'affinité de Dnf1p pour la PC. Ces données suggèrent qu'ALA10

pourrait aussi avoir une affinité pour la PC plutôt que pour la PS (Baldrige and Graham, 2013).

Une étude sur la localisation subcellulaire d'ALA10 en microscopie confocale est aussi en cours et pourrait nous permettre de construire un modèle intégrant ALA10 dans le schéma cellulaire présenté dans la Partie Bibliographique. Concernant les espèces précises de glycérolipides remaniés par l'action de cette flippase putative, il faudra également mener des études biochimiques permettant de préciser la nature du substrat d'ALA10.

Conclusion

Conclusion

Chez les plantes, le MGDG (monogalactosyldiacylglycerol) et le DGDG (digalactosyldiacylglycerol) sont les lipides les plus abondants des membranes du chloroplaste. Leur synthèse, localisée exclusivement dans l'enveloppe plastidiale, est catalysée par des MGDG synthases (MGD1, MGD2 et MGD3) et des DGDG synthases (DGD1 et DGD2). Les galactolipides composent l'essentiel de la matrice membranaire des thylacoïdes et s'associe spécifiquement à certaines protéines dont les complexes photosynthétiques.

L'invalidation du gène codant pour MGD1 (mutant *mgd1-2*), est létale. Le mutant *mgd1-2* ne croît qu'en présence de saccharose avec une diminution importante de la taille de la plante et présente une détérioration des membranes photosynthétiques conduisant à un dysfonctionnement de la photosynthèse et de la croissance autotrophe. L'analyse du mutant *mgd1-2* montre donc que la présence du MGDG est essentielle pour la plante et qu'une compensation par l'expression de MGD2 et de MGD3 n'est possible que lorsque la plante est placée en carence de Pi. L'étude du rôle des MGDs par la génétique classique est donc rendue difficile de par le phénotype très sévère suite à la mutation de *MGD1* et de par le fait que *MGD2* et *MGD3* soient apparemment dispensables.

Avant mon arrivée au laboratoire, notre équipe a réalisé un criblage chimique à haut débit de petites molécules inhibitrices de MGD1 chez *Arabidopsis*. A l'issue de ce criblage, la molécule inhibitrice de MGD1 la plus efficace a été identifiée et appelée galvestine-1. Cette nouvelle molécule agit au niveau moléculaire par compétition avec la liaison du DAG au niveau de son site de fixation sur MGD1. La galvestine-1 inhibe toute la famille multigénique des MGDG synthases, soient *MGD1*, *MGD2* et *MGD3*. Le traitement d'*Arabidopsis* avec de la galvestine-1 a donc permis l'analyse d'une condition qui n'a jamais pu être testée par des approches génétiques auparavant, c'est-à-dire en ciblant tous les membres de la famille multigénique des MGDG synthases dans le même fond génétique. La galvestine-1 a donc été un outil de choix pour perturber le système des glycérolipides membranaires au niveau de la synthèse des galactolipides et permettre son étude.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis de progresser dans la compréhension des processus impliqués dans l'homéostasie des lipides membranaires chez *Arabidopsis thaliana* :

Conclusion

- Par l'étude de lignées mutées au méthanesulfonate d'éthyle (EMS), résistante à la galvestine-1 ;
- Par l'identification de nouveaux acteurs potentiels pouvant être impliqués dans l'homéostasie des lipides membranaires chez *Arabidopsis thaliana*, à partir de deux lignées résistantes étudiées plus en détail ;
- Par l'étude de la flippase putative ALA10, surexprimée en présence de galvestine-1 et impliquée dans la synthèse des galactolipides chez *Arabidopsis*.

Tout d'abord, la partie la plus importante de ma thèse a consisté à réaliser un crible d'une collection de mutants d'*Arabidopsis thaliana* générés par traitement en présence d'EMS afin d'identifier les plants résistants à la galvestine-1. Ce criblage a permis de sélectionner 15 lignées gali. Le fait d'avoir isolé un nombre peu élevé de lignées résistantes pourrait indiquer qu'un faible nombre de voies spécifiques soient touchées. Plusieurs lignées gali pourraient être mutées dans la même voie ou même être alléliques.

Les lignées gali1 et gali2 montrent une augmentation de MGDG en présence de galvestine-1 et une production de DGDG stable. Ces deux lignées présentent une augmentation de la synthèse de PG thylacoïdien, en présence de galvestine-1. Une hypothèse possible pourrait être que la mutation conférant la résistance à la galvestine-1 dans les lignées gali1 et gali2 pourrait toucher la voie procaryote, alimentant d'une part (i) la biosynthèse de MGDG procaryotique, et d'autre part (ii) la biosynthèse de PG, un activateur de MGD1. L'augmentation de la production de MGDG et le maintien de la teneur en DGDG, compenseraient ainsi partiellement les effets de la galvestine-1. L'ensemble de ces résultats est cohérent avec une biogenèse des lipides chloroplastiques protégée de l'effet de la galvestine-1. La redondance des phénotypes lipidique des lignées gali1 et gali2 semble cohérente avec l'hypothèse que plusieurs lignées gali pourraient être mutées dans la même voie ou même être alléliques.

Une première analyse bio-informatique du séquençage NGS du génome de la lignée gali1 a permis d'identifier trois gènes candidats mutés, soient le gène codant pour une protéine de type ZKT (appelée dans ce manuscrit "protéine ZKT" bien que le gène ne soit pas formellement annoté), contenant un domaine PDZ, un domaine K-box et une région TPR (Tetratricopeptide repeat), un gène candidat muté codant pour une protéine de la famille des core-2/1 branching β -1,6N-acétylglycosaminyltransferase et un gène candidat muté pour une protéine de la famille des facteurs de terminaison de la transcription mitochondriale. La

Conclusion

présence de la mutation dans le gène codant pour la protéine de type ZKT a été confirmée par séquençage direct de la région non recombinante identifiée par l'analyse bio-informatique du séquençage NGS. D'après les données transcriptomiques de plantes traitées en présence de galvestine-1 pendant 13 jours, seul le gène codant pour la protéine de type ZKT est sous-exprimé parmi tous les gènes candidats identifiés dans la lignée *gali1*. Les deux autres gènes candidats mutés codant pour la protéine de la famille des core-2/1 branching β -1,6N-acétylglucosaminyltransferase et pour une protéine de la famille des facteurs de terminaison de la transcription mitochondriale ont également été confirmés par séquençage direct de la lignée *gali1*. Une deuxième analyse bio-informatique du séquençage NGS du génome de la lignée *gali1* a permis d'identifier quatre gènes candidats mutés non étudiés à ce jour. Le séquençage direct de ces gènes candidats nouvellement identifiés est prévu. Un test de co-ségrégation du phénotype et des mutations est en cours pour établir quelle mutation confère la résistance à la galvestine-1. Une fois le gène candidat conférant la résistance à la galvestine-1 identifié, une complémentation des lignées mutées avec le gène sauvage sera engagée, afin de confirmer si la mutation confère en effet la résistance à la galvestine-1.

L'ensemble des résultats nous indique que bien que les phénotypes lipidique soient redondants dans les lignées *gali1* et *gali2*, il est possible que les mutations soient différentes. En effet, le séquençage de 3 gènes candidats sur 7 identifiés dans le génome de *gali1* lors de la première analyse bio-informatique du séquençage NGS montre qu'aucune mutation n'est retrouvée dans la lignée *gali2*. Un séquençage NGS du génome de la lignée *gali34* a permis également d'identifier des gènes candidats mutés qui pourraient conférer la résistance à la galvestine-1. Comme pour la lignée *gali1*, à ce stade d'étude il est encore difficile de savoir quel gène muté confère la résistance à la galvestine-1 dans cette lignée. Une autre partie de ma thèse a été de mener une étude de type "gène candidat" à partir de l'analyse des données transcriptomiques issues de plantes ayant été traitées en présence de galvestine-1 avant mon arrivée au laboratoire. A partir de ces données, nous nous sommes ainsi focalisés sur *ALA10*, une flippase putative dont le gène est surexprimé en présence de galvestine-1 mais aussi en carence de phosphate. L'étude du gène candidat *ALA10* a permis de montrer un lien possible entre la flippase putative et la synthèse des galactolipides. Les analyses par RT-PCR quantitatives suggèrent que l'expression du gène *ALA10* est vraisemblablement corrélée à celle des gènes *MGD2* et *MGD3*. En effet, l'invalidation d'*ALA10* conduit à une chute de l'expression de ces gènes. Ensuite, l'augmentation de l'expression du gène *ALA10* s'accompagne une augmentation de l'expression du gène *MGD2*. L'analyse plus précise de

Conclusion

l'expression de *MGD3* dans les différentes lignées devrait permettre de déterminer si un effet semblable est observé. Ces résultats devront être confirmés dans la lignée ALA10-GFP2.

La comparaison du développement racinaire de plantules WT, du mutant *ala10* et des lignées ALA10-GFP1 et ALA10-GFP2, en présence de galvestine-1 suggère que l'expression d'*ALA10* pourrait aussi être corrélée à la longueur des racines. La surexpression d'*ALA10* conférerait dans ce cas un phénotype résistant partiel à la galvestine-1. La galvestine-1 induit une augmentation de l'expression du gène *ALA10* et la surexpression d'*ALA10-GFP* conduit à une augmentation de l'expression de *MGD2* et *MGD3*, ce qui pourrait suggérer un rôle possible d'*ALA10* en amont de la production de MGDG. La galvestine-1 stimulant la voie eucaryotique extraplastidiale, il est envisageable qu'*ALA10* soit une flippase jouant un rôle dans l'alimentation du chloroplaste en substrats glycérolipidiques.

L'alignement de la séquence protéique d'*ALA10* avec les flippases de la levure montre qu'*ALA10* contient plusieurs résidus communs à Dnf1p qui jouent un rôle dans l'affinité de Dnf1p pour la PC. Ces données suggèrent qu'*ALA10* pourrait avoir une affinité pour la PC. La caractérisation de la spécificité de substrat d'*ALA10* devrait nous permettre d'avoir plus de précision sur son rôle exact dans l'homéostasie lipidique. Des études sont menées actuellement pour évaluer la possibilité qu'*ALA10* complémente le phénotype de *Saccharomyces cerevisiae* délété de la flippase Drs2p (collaboration avec Patrice Catty, Chimie et Biologie des Métaux, CBM, CEA Grenoble), ce qui confirmerait la fonction de flippase d'*ALA10*. Des études biochimiques sont prévues pour avoir plus d'information sur le substrat d'*ALA10*. Une étude sur la localisation d'*ALA10* au niveau subcellulaire est en cours.

Toutes ces informations permettront d'apporter plus de précisions sur la fonction d'*ALA10* chez *Arabidopsis* et de l'intégrer au modèle du système glycérolipidique. La démarche entreprise pour caractériser le rôle d'*ALA10* servira aussi de trame pour les études futures des gènes identifiés dans les lignées gali.

Annexes

Liste des publications

Boudiere L and Marechal E Screening for inhibitors of chloroplast galactolipid synthesis acting in membrane and in planta. *Protocols Plant Chemical Biology*. Springer (in press)x

Boudiere L, Michaud M, Petroutsos D, Rebeille F, Falconet D, Bastien O, Roy S, Finazzi G, Rolland N, Jouhet J, Block MA, Marechal E (2013) Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking. *Biochim Biophys Acta*

Boudiere L, Botte CY, Saidani N, Lajoie M, Marion J, Brehelin L, Yamaryo-Botte Y, Satiat-Jeunemaitre B, Breton C, Girard-Egrot A, Bastien O, Jouhet J, Falconet D, Block MA, Marechal E (2012) Galvestine-1, a novel chemical probe for the study of the glycerolipid homeostasis system in plant cells. *Mol Biosyst* **8**: 2023-2035, 2014

Dubots E, Botte C, Boudiere L, Yamaryo-Botte Y, Jouhet J, Marechal E, Block MA (2012) Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis. *Biochimie* **94**: 86-93



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbabbio

Review

Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking[☆]

Laurence Boudière, Morgane Michaud, Dimitris Petroutsos, Fabrice Rébeillé, Denis Falconet, Olivier Bastien, Sylvaine Roy, Giovanni Finazzi, Norbert Rolland, Juliette Jouhet, Maryse A. Block^{*}, Eric Maréchal^{*}

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Végétale, CNRS UMR 5168, CEA IRTSV, Univ. Grenoble Alpes, INRA USC 1359, CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054, Grenoble Cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 May 2013

Received in revised form 30 August 2013

Accepted 8 September 2013

Available online xxx

Keywords:

Galactolipid

Monogalactosyldiacylglycerol

Digalactosyldiacylglycerol

Phosphatidylglycerol

Sulfolipid

Sulfoquinovosyldiacylglycerol

ABSTRACT

Glycerolipids constituting the matrix of photosynthetic membranes, from cyanobacteria to chloroplasts of eukaryotic cells, comprise monogalactosyldiacylglycerol, digalactosyldiacylglycerol, sulfoquinovosyldiacylglycerol and phosphatidylglycerol. This review covers our current knowledge on the structural and functional features of these lipids in various cellular models, from prokaryotes to eukaryotes. Their relative proportions in thylakoid membranes result from highly regulated and compartmentalized metabolic pathways, with a cooperation, in the case of eukaryotes, of non-plastidic compartments. This review also focuses on the role of each of these thylakoid glycerolipids in stabilizing protein complexes of the photosynthetic machinery, which might be one of the reasons for their fascinating conservation in the course of evolution. This article is part of a Special Issue entitled: Dynamic and ultrastructure of bioenergetic membranes and their components.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The glycerolipid composition of photosynthetic membranes (thylakoid lipidome) has been remarkably conserved in the course of evolution, from cyanobacteria to chloroplast-containing eukaryotes [1–3]. Glycerolipids are a category of lipids having a 3-carbon glycerol scaffold (each carbon is numbered following the stereospecific numbering nomenclature *sn*-1, *sn*-2, *sn*-cp3), harboring one or two acyl chains esterified at positions *sn*-1 and *sn*-2, and a polar head at position *sn*-3 (Fig. 1). Table 1 shows that primary chloroplasts (i.e. photosynthetic plastids deriving from a primary endosymbiosis), analyzed from green algae to vascular plants [4–6], have a unique glycerolipid composition compared to other subcellular compartments: they are characterized by a very low content in phosphoglycerolipids, mostly PG (phosphatidylglycerol), PC

(phosphatidylcholine), and PI (phosphatidylinositol), and a very high content in glycolipids that contain no phosphorus, mainly MGDG (monogalactosyldiacylglycerol), DGDG (digalactosyldiacylglycerol) and SQDG (sulfoquinovosyldiacylglycerol). This table also shows that MGLcDG (monoglucosyldiacylglycerol) is uniquely detected in cyanobacteria and is not found in chloroplasts. These very basic observations highlight the conservation of a quartet of lipids, i.e. MGDG, DGDG, SQDG and PG, from cyanobacteria to primary chloroplasts and raise questions regarding (i) the roles that these lipids may have in photosynthesis and (ii) the molecular processes establishing and regulating this unique lipid profile. Here, we summarize our current knowledge on the generic and specific roles of thylakoid lipid classes, focusing on their relation with photosynthesis, based on converging evidence from biochemical, biophysical, physiological, genetic and chemical genetic studies. We then detail our current understanding on the dynamic processes that establish and control this very peculiar and essential lipid composition in different biological models, in various physiological contexts and in response to environmental factors.

2. Classes of glycerolipid found in photosynthetic membranes

2.1. Neutral glycolipids: galactoglycerolipids (monogalactosyldiacylglycerol and digalactosyldiacylglycerol)

Galactoglycerolipids are the most abundant lipids in photosynthetic membranes. They comprise two major structures, conserved from cyanobacteria to primary chloroplasts, based on the number of galactose residues in their polar head, i.e. MGDG (1,2-diacyl-3-O-(β-D-galactopyranosyl)-*sn*-glycerol) and DGDG (1,2-diacyl-3-O-(α-

Abbreviations: AT1, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase; AT2, 1-acylglycerol-phosphate acyltransferase; DAG, diacylglycerol; DGD1 and DGD2, digalactosyldiacylglycerol synthase 1 and 2; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; IEM, inner envelope membrane of the chloroplast; LHCII, light harvesting complex II; MGLcDG, monoglucosyldiacylglycerol; MGD1, MGD2 and MGD3, monogalactosyldiacylglycerol synthase 1, 2 and 3; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; OEC, oxygen evolving complex; OEM, outer envelope membrane of the chloroplast; PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; Psb, lumenal extrinsic proteins of the oxygen evolving complex, interacting with photosystem II (includes PsbO, PsbU, PsbV, PsbQ and PsbP); PSI, photosystem I; PSII, photosystem II; Q_A, primary quinone acceptor; Q_B, diffusing quinone; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycerol; WT, wild type

[☆] This article is part of a Special Issue entitled: Dynamic and ultrastructure of bioenergetic membranes and their components.

^{*} Corresponding authors. Tel.: +33 438 78 49 85.

E-mail addresses: maryse.block@cea.fr (M.A. Block), eric.marechal@cea.fr (E. Maréchal).

0005-2728/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabbio.2013.09.007>

Please cite this article as: L. Boudière, et al., Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking, Biochim. Biophys. Acta (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabbio.2013.09.007>

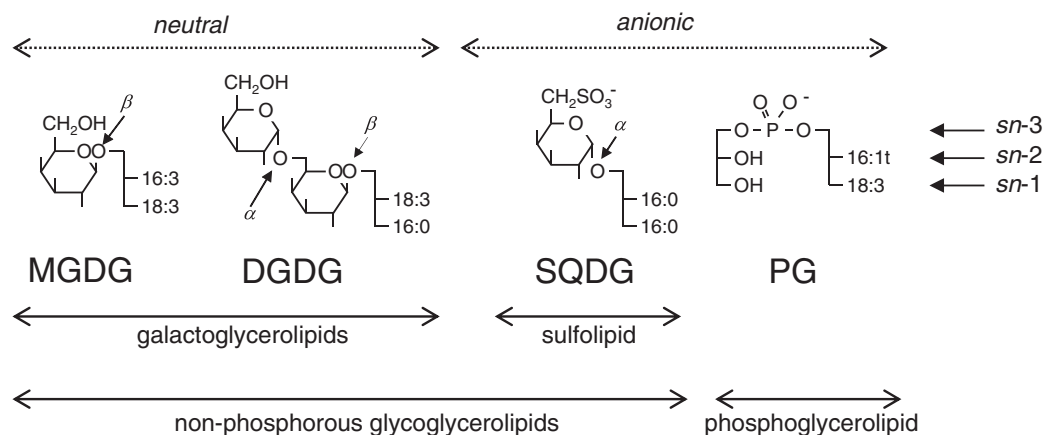


Fig. 1. Main glycerolipid classes conserved in photosynthetic membranes from cyanobacteria to primary chloroplasts of algae and plants. In this illustration of representative lipids from thylakoids of *Arabidopsis* chloroplasts, positions *sn*-1 and *sn*-2 of the glycerol backbone are esterified to fatty acids with 16 or 18 carbon atoms and position *sn*-3 harbors the polar head. MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycerol; PG, phosphatidylglycerol.

D-galactopyranosyl-(1 → 6)-O-β-D-galactopyranosyl)-*sn*-glycerol) [7,8] (Fig. 1). Due to the extensive surface of thylakoids in cyanobacteria, algae and plant cells, MGDG and DGDG constitute the most profuse lipid class on earth [9].

Galactoglycerolipids, and mostly MGDG, are characterized by their high content of polyunsaturated fatty acids. In angiosperms, MGDG contains mostly 16- and 18-carbon ω-3 trienoic acids, i.e. *cis*-7,10,13-hexadecatrienoic acid (16:3) and *cis*-9,12,15-octadecatrienoic acid (18:3) respectively [10]. In algae, MGDG often contains very long chain polyunsaturated acids, with more than 20 carbon atoms and more than 3 double bonds such as eicosapentaenoic acid [11,12]. When present, 16:3 is exclusively at position *sn*-2 of MGDG. In angiosperms, DGDG is mainly 18:3-rich; however, by contrast with MGDG, when a 16-carbon fatty acid is present, DGDG contains mostly the saturated form, palmitic acid (16:0) at position *sn*-1 of the glycerol backbone.

The MGDG/DGDG and galactoglycerolipid/phosphoglycerolipid ratios appear stable, at least in angiosperms, when plants grow under favorable controlled conditions, i.e. when fed with sufficient nutrient sources. This observation supports the existence of a controlled steady state. This steady state was shown to respond to environmental changes. On the one hand, (i) environmental stresses that could be detrimental for membrane integrity, like freezing, drought or exposure to ozone, induce the accumulation of additional galactoglycerolipids, i.e. a specific DGDG with a β-galactopyranosyl-(1 → 6)-β-galactopyranosyl polar head instead of the α-galactopyranosyl-(1 → 6)-β-galactopyranosyl polar head and tri- and tetra-galactoglycerolipids in chloroplasts of angiosperms [13–17]. This phenomenon seems to be a recent invention in the evolution of land plants, but will not be discussed in more details in this review. On the other hand, (ii) a shortage of phosphate in the environment was shown to trigger a significant increase of the galactoglycerolipid/phosphoglycerolipid ratio, from algae [18] to land

Table 1
Representative glycerolipid compositions of membranes from cyanobacteria and chloroplasts from green algae and angiosperms. The distribution of main glycerolipids is given in percents of total lipid mass. Detected phosphoglycerolipids include PC (phosphatidylcholine), PE (phosphatidylethanolamine), PI (phosphatidylinositol) and PG (phosphatidylglycerol). DPG (diphosphatidylglycerol or cardiolipin), a marker of the contamination by mitochondrial membranes, was below the detection threshold. Conserved glycolipids consist of MGDG (monogalactosyldiacylglycerol), DGDG (digalactosyldiacylglycerol) and SQDG (sulfoquinovosyldiacylglycerol). MGLcDG (monoglucosyldiacylglycerol) is uniquely detected in cyanobacteria.

	Phosphoglycerolipids					Non-phosphorous glycolipids			
	PC	PE	PI	DPG	PG	MGLcDG	MGDG	DGDG	SQDG
<i>Membranes from cyanobacteria (Synechocystis PCC 6308)^a</i>									
Envelope and thylakoids	–	–	–	–	11.4	1.7	52	11.7	22
<i>Chloroplasts from green algae (Chlamydomonas reinhardtii)^b</i>									
Envelope membranes	*	4.6	4.1	–	3.5	–	27	31	8
Thylakoids	*	–	2.7	–	6	–	55	20	13
<i>Chloroplasts from angiosperm leaves (Spinacia oleracea)^c</i>									
Envelope membranes									
Total	20	–	4	–	9	–	32	30	6
OEM	32	–	5	–	10	–	17	29	6
IEM	6	–	1	–	8	–	49	30	5
Thylakoids	4.5	–	1.5	–	9.5	–	52	26	6.5
<i>Etioplasts from angiosperm (Pisum sativum)^d</i>									
Envelope membranes	17	–	4	–	5	–	34	31	6
Prolamellar body	9	–	2	–	5	–	42	35	6

^a Present article.

^b [4].

^c [5].

^d [6].

* 21% and 5% of an additional lipid was observed in *Chlamydomonas* in the envelope and thylakoids respectively, initially identified as PC; this phosphoglycerolipid being absent in *Chlamydomonas*, other lipids like DGTS (diacylglyceroltrimethylhomoserine) might be contaminants of envelope preparations.

plants [19]. Galactoglycerolipids have long been considered to be restricted to plastids, however a relocation of DGDG to non-plastid membranes following phosphate shortage was demonstrated a decade ago, at least in angiosperms [19] and is now considered as a major process of the cell membrane lipid homeostasis. In brief, DGDG is exported to various extraplastidial membranes [20–22], where it can substitute phosphoglycerolipids [1,20,23,24]. We still do not know if this export also occurs in algae: experimental evidence should be provided in the future to assess whether DGDG transfer is a universal phenomenon or if it is restricted to vascular plants. Chloroplast being an organelle with a very rapid phosphate turn over, it is possible that its high proportion of galactoglycerolipids helps saving phosphate. Thus, the ability to replace phosphoglycerolipids by DGDG might be the basis for a positive selection pressure, adding to the fitness of plants, and sustaining the conservation of galactoglycerolipids in the course of evolution.

In algae and plants exposed to various abiotic or biotic stresses, polyunsaturated fatty acids can be released from galactoglycerolipids [25] and converted into oxylipins, including jasmonic acids (JAs) [26]. Phosphoglycerolipids can also provide the polyunsaturated fatty acids required for the generation of oxylipins, and in the red alga *Gracilaria*, both galactoglycerolipids and phosphoglycerolipids are utilized [27]. Interestingly, in *Arabidopsis*, MGDG and DGDG can also directly harbor oxo-phytyldienoic acyls [26] and other oxygenated fatty acids [28,29], forming a species-specific class of galactoglycerolipids, called the 'arabidopsides' that accumulate in chloroplast membranes under certain conditions like pathogen attacks. The presence of arabidopsides seems restricted to a very small number of species analyzed to date and their importance in angiosperms is currently debated.

2.2. Anionic glycolipid: sulfoquinovosyldiacylglycerol

SQDG is a unique glycerolipid, characterized by a sulfur-containing anionic polar head (1,2-diacyl-3-O-(6-sulfo-6-deoxy- α -D-glucosyl)-sn-glycerol) [30–33] (Fig. 1). The proportion of the sulfolipid in photosynthetic membranes is the lowest in the quartet of lipids conserved from cyanobacteria to chloroplasts. Its proportion in algae and plants ranges from about 2 to 20% with recorded peaks at 50% [34]. A series of in vitro analyses have shown that this lipid interacts with photosynthetic proteins, the import machinery and some annexins [34] (see below). Genetic disruption in *Arabidopsis* leading to a complete loss of SQDG [35] indicated that, in vivo and under normal growth conditions, SQDG was nevertheless dispensable. This observation suggested that SQDG function might be compensated by another lipid. Based on the initial observation that SQDG synthetic genes were specifically induced upon phosphate starvation, and following important physiological and genetic analyses [36–42], it was shown that the SQDG level was linked to that of PG, with a SQDG/PG ratio tuned in response to phosphate availability, a phenomenon again conserved from cyanobacteria to vascular plants [34,41].

2.3. Anionic phospholipid: phosphatidylglycerol

Among the quartet of lipids, PG is the only phosphoglycerolipid that has been conserved in photosynthetic membranes from prokaryotes to eukaryotes [43]. In angiosperms and numerous algae analyzed to date, thylakoid PG is characterized by the presence of a unique fatty acid molecular species, *trans*-3-hexadecenoic acid (C16:1t), located exclusively at position sn-2 of the glycerol backbone (Fig. 1). This fatty acid is important for structural interaction with proteins (see below). The phospho-glycerol polar head of PG is negatively charged (Fig. 1) like that of SQDG, and as mentioned above, PG levels are inversely correlated with those of SQDG. Upon phosphate shortage, the level of PG in photosynthetic membranes decreases significantly, being compensated by an increase of the sulfolipid level [34,40–42]. Attempts to genetically impair PG synthesis in *Arabidopsis* have shown that a complete abolition of PG in chloroplast was lethal [44]. After disruption of the PGP1 gene in

the *Arabidopsis* genome, plants could only grow in presence of sucrose and chloroplast development was impaired [45]. By contrast, although the PGP1 gene encodes isoforms that can be targeted to both the chloroplast and the mitochondrion, the respiratory organelle was not altered by the PGP1 knock out, showing that mitochondria could alternatively import PG from the ER for the biosynthesis of the cardiolipin [46]. An *Arabidopsis* mutant with low PG levels in chloroplasts exhibits an impairment of growth and reduced photosynthesis, a phenotype that is more severe when combined with a genetic disruption of SQDG synthesis [42]. PG is also involved in the tolerance to chilling [43]. In summary, PG is therefore a vital lipid, mainly for its role as a cofactor of photosystems (see below), and SQDG appears as a sort of stand-in actor, playing parts of PG functions when phosphate is limited.

2.4. Other glycerolipids

Presence of other glycerolipids in chloroplasts of eukaryotic cells, besides the MGDG/DGDG/PG/SQDG quartet, has been proposed based on analyses of subcellular and suborganellar membrane fractions. PC has thus been detected in various proportions in the envelope membranes and in the thylakoids prepared from spinach leaves [5,6] (see Table 1). Could PC be a contaminant from other subcellular membranes in the process of chloroplast purification? Following incubation of intact chloroplasts with a non-specific phospholipase C (PLC, an enzyme cleaving the polar head of phospholipids and releasing DAG), it was shown that PC was mainly located in the outer envelope membrane of chloroplasts, more precisely in the cytosolic leaflet [47]. At the level of photosynthetic membranes, PC is undetectable in thylakoids purified from PLC-treated chloroplasts of *Spinacia* [47] but measurable in thylakoids from chloroplasts of *Pisum* [48]. It is not clear whether this latter observation is due to an actual presence of PC in thylakoids or a contamination. PE was also detected in thylakoids of chloroplasts from *Chlamydomonas* [5], but the question of a possible contamination by non-plastidic PE is, to our knowledge, unresolved, especially considering that it is difficult to get rid of the 10–15% contamination by mitochondria when purifying chloroplasts from *Chlamydomonas* [49]. Since mitochondrial membranes contain up to 50% PE this could explain the detection of this lipid in purified membrane fractions from *Chlamydomonas*. Presence of PI is less controversial and has been reported in all thylakoids isolated so far from algae or plant chloroplasts, with proportions ranging from 1 to 5% (see Table 1). However, no clear function has been proposed for this very interesting lipid class in the context of photosynthesis.

In addition to membrane polar glycerolipids, chloroplasts can also contain substantial amounts of triacylglycerol (TAG). In green algae like *Chlamydomonas*, TAG can be synthesized within chloroplasts following nutrient starvations [50,51], subsequently forming oil droplets in the stroma. In angiosperms, various stresses including nutrient shortage can trigger the accumulation of lipid droplets within chloroplasts, called plastoglobuli, containing TAG together with plasto-hydroquinone, and α -tocopherol [52–54]. As mentioned above, freezing, drought stresses or exposure to ozone, trigger the production of tri- and tetragalactoglycerolipids from preexisting galactoglycerolipids, following the activation of a galactolipid:galactolipid galactosyltransferase, thus leading to the accumulation of diacylglycerol (DAG) that serves as substrate for the production of TAG [13–17]. TAG can thus be generated in chloroplasts following a broad range of stresses, using a DAG substrate generated by the hydrolysis of galactoglycerolipids. The biogenesis of chloroplast TAG droplets and their structural relationship with thylakoid membranes are still poorly understood.

2.5. Major features of thylakoid lipid homeostasis

In summary, thylakoid membranes are composed of lipid classes that have been conserved over evolution, i.e. MGDG, DGDG, SQDG and PG. Their relative proportions are stable, indicating the presence of

mechanisms establishing and controlling a steady state (homeostasis) of the membrane lipidome in thylakoids, in given environmental and physiological contexts. The thylakoid lipidome results from the activities of biosynthetic enzymes that generate each lipid, the trafficking of lipid intermediates, the catabolic pathways and the regulatory processes that ensure that appropriate proportions are reached [55]. This composition is adjusted in response to environmental changes. Main features of this lipid homeostasis consist in a control of the MGDG/DGDG and the SQDG/PG ratios within the thylakoids of cyanobacteria and chloroplasts, and the galactoglycerolipid/phosphoglycerolipid (or DGDG/PC) ratio at the whole cell level in chloroplast-containing eukaryotes. It is therefore possible to dissect the structural and functional roles of these lipid classes in the local context of photosynthetic membranes and, in a more global context, in the complex dialog between the chloroplast and other subcellular membrane compartments.

3. Structural and functional roles of thylakoid lipids

3.1. Glycerolipids make the bulk of photosynthetic membranes

The first and most obvious basic role of polar glycerolipids in thylakoids is to constitute the lipophilic matrix in which photosystems are embedded. The cumulative surface of photosynthetic membranes is extraordinarily amplified by the organization as flat cisternae, which can form piles within the stroma, reaching, for example in angiosperms, a total area of hundreds of square meters of photosynthetic membranes per square meter of green tissues [55]. The role played by each lipid class in the 'membrane mosaic' relies on their physicochemical properties, including:

- the ability of MGDG to form reverse micelles (Hexagonal II) [56], a property which might be beneficial in highly curved membrane domains or at the vicinity of some large protein complexes;
- vice versa the ability of DGDG to stabilize membrane bilayers (bilayer-forming lipids) [56];
- the presence of 'rigid' sugars (i.e. hexose residues in cyclic conformations) in the polar head of glycolipids and of a 'flexible' phospho-glycerol (linear chain of three carbons) in PG;
- the absence of charges in MGDG and DGDG and the presence of a negative charge in PG and SQDG.

The integrity of photosynthetic membranes is thus likely to rely on an appropriate proportion of membrane-stabilizing lipids, mainly DGDG, of Hexagonal II MGDG that might enable the presence of highly curved regions (although this remains to be demonstrated), and on a smaller proportion of charged polar heads, mainly from PG and SQDG, as their excess might result in inappropriate repulsive forces between neighboring membranes (to be demonstrated as well) [57].

This matrix should allow the lateral diffusion of the photosystems, the diffusion of plastoquinone between protein complexes, and some highly dynamic remodeling processes like photosynthetic state transitions [58–61]. The lipid/protein ratio in the thylakoids is 0.6–0.8 mg mg protein⁻¹, whereas this ratio is close to 1.0 in the inner envelope membrane (IEM) and 2.5–3.0 in the outer envelope membrane (OEM) [2,3]. Photosynthetic membranes are therefore crowded by protein complexes and the lateral mobility might be relatively limited. A segregation of membrane proteins in domains with very low lipid content is observed at least in non oxygenic photosynthesis [62]. Membrane crowding with proteins could play a role in essential processes in photosynthesis, like light harvesting by the antenna complexes and the repair of the photosynthetic machinery upon photodamage ([63–66], see also below). The presence of multiple double bonds in fatty acids of galactoglycerolipids and the abundance of the Hexagonal II-MGDG might ease the lateral dynamics in this packed environment. The low lipid/protein ratio in thylakoids also highlights that in addition to their role in the lipid mixture, each lipid class might be also important at the level of individual molecules, by interacting with protein complexes.

3.2. Glycerolipids are critical for the structural stabilization and function of photosystems

MGDG, DGDG, SQDG and PG associate specifically with protein complexes including photosystems [67,68] and the plastid protein import machinery [69]. SQDG at the outer surface of the OEM is also likely to specifically bind to an annexin [70], thus giving a molecular basis for a possible dialog (signaling, coordination) between chloroplast lipids and cytosolic partners.

Lipids have been identified as possible 'cofactors' for complexes involved in photosynthesis (i.e. bound to dedicated binding pockets at the surface of protein subunits) based on (i) X-ray crystallographic studies, mostly performed in cyanobacteria, combined with (ii) biochemical characterizations of lipids extracted from purified protein fractions [67,68]. Most analyses summarized below suggest that lipid interaction with proteins is more important with photosystem II (PSII) (Fig. 2).

The X-ray crystallographic study of PSII from *Thermosynechococcus elongatus* has thus shown the presence of 6 to 11 MGDG, 4 to 7 DGDG, 3 to 5 SQDG and 1 to 2 PG molecules per PSII complex [71,72] (Fig. 2). In the most recent crystallographic study of *T. elongatus* PSII, 6 MGDG, 5 DGDG, 4 SQDG and 5 PG molecules were present per monomer, together with 3 additional unassigned lipids and 15 single alkyl chains, among which some may be lipids [73]. Consistently, the analysis of lipids extracted from the purified PSII of *Thermosynechococcus vulcanus* indicated the presence of 8 MGDG, 6 DGDG, 6 SQDG and 8 PG per PSII complex [74]. Lipids extracted from the PSII of *Synechocystis* PCC 6803 also showed the association with 6 MGDG, 3 DGDG, 5 SQDG and 6 PG [74].

By contrast with this strong association of lipids to PSII, the X-ray study of the light harvesting complex II (LHCII) from *Spinacia oleracea* showed only 1 DGDG and 1 PG per LHCII complex [75] and the structure of PSI of *Thermosynechococcus elongatus* supported the association with only 1 MGDG and 3 PG per PSI complex [76]. The X-ray analysis of the cytochrome *b6f* complex (Cyt *b6f*, plastoquinol-plastocyanin reductase) from *Mastigocladus laminosus* indicated the possible interaction with 1 PC [77], whereas the resolution of the Cyt *b6f* of *Chlamydomonas reinhardtii* supported the likely interaction with only 2 MGDG and 1 SQDG per complex [78]. Based on the unique detection of monomers following delipidation of Cyt *b6f* from *Chlamydomonas*, it was suggested that lipids could maintain the dimeric structure of the Cyt *b6f* complex [79].

The observation of glycerolipids associated to a protein complex is not sufficient to assess that they are critical for the function of the complex. Clues regarding the role of these lipids as possible functional cofactors could be deduced from genetic studies.

- MGDG: The analysis of the role of MGDG in photosynthetic organisms cannot be achieved by a complete abolition of the synthesis of this lipid, which leads to a lethal phenotype regarding its role as precursor of the main lipid class of thylakoids. Mutants of *Arabidopsis* containing significantly less MGDG could nevertheless be obtained by *knocking down* (KD) or *knocking out* (KO) *MGD1*, one of the three genes coding for MGDG synthases mostly involved in thylakoid-MGDG production [80–83]. The synthesis of MGDG could also be tuned down chemically using a specific inhibitor of MGDG synthases called galvestine-1 [55,84]. The *mgd1-1* KD mutant exhibited a deficiency in chlorophyll content, a defect in chloroplast development and a severe growth phenotype [80]. The *mgd1-2* KO did not contain any chlorophyll in standard conditions and could only grow on sucrose-supplemented media [85]. Galvestine-1-treated *Arabidopsis* also showed this strong chlorotic phenotype, a defect in thylakoid development and an impairment of growth [55,84]. MGDG reduction has therefore a drastic impact on the complete structure of the thylakoid membranes, an impact that one would obviously expect for such an abundant lipid. In the *mgd1-1*

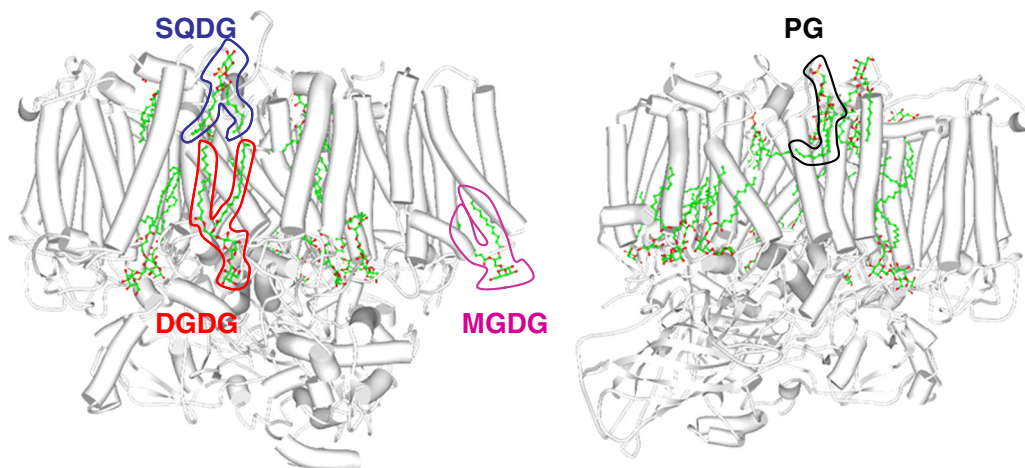


Fig. 2. Thylakoid lipids associated to the monomeric form of cyanobacterial Photosystem II. These two lateral views of the PSII structure of *Thermosynechococcus elongatus* solved by Guskov et al. in 2009 were obtained from the Protein Data Bank (PDB ID: 3KZ1) and visualized using Protein Workshop so as to show chloroplast lipid ligands. Examples of phosphatidylglycerol (PG), sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG), mono and digalactosyldiacylglycerol (MGDG, DGDG) are circled.

mutant, the linear electron flux capacity was diminished by 25–30% when calculated per leaf area, but was comparable to the WT when normalized to chlorophyll content. Functional analysis of the PSII performances in these mutants showed no major effect on PSII, suggesting that the remaining MGDG (40% of WT level) might be sufficient to maintain the structure and function of this complex [86]. Nevertheless, after high-light exposure, the *mgd1-1* mutant suffered from increased PSII photoinhibition as a result of inefficient non-photochemical quenching (NPQ; thermal dissipation of excess light energy in the PSII antenna bed during short-term high-light stress) [87,88].

- DGDG: A mutant of *Synechocystis* totally lacking DGDG could be obtained by *knocking out* the *dgdA* gene (coding for the cyanobacterial DGDG synthase), allowing an investigation of the role of this lipid in cyanobacteria [89–91]. Growth of *dgdA*[−] mutants was not affected in low light, and photosynthesis appeared identical to WT. Under high light intensity or high temperature, growth was altered and a phenotype similar to that of mutants altered at the level of the subunits of the oxygen evolving complex (OEC), was observed [89,90]. In photosynthetic organisms, the extrinsic domain of PSII is responsible for water splitting. In the current understanding, the cyanobacterial OEC is composed of PsbO, PsbU, PsbV, PsbQ and PsbP, whereas in green algae and plants, subunits U and V have been lost [92,93]. In the *dgdA*[−] mutant, PsbU is dissociated from PSII and DGDG appears therefore as a critical lipid to shape the final structure of PSII through the binding of extrinsic proteins stabilizing the OEC. Mutants of *Arabidopsis* containing significantly less DGDG could also be obtained by knocking out two genes encoding enzymes generating this lipid in *Arabidopsis*, i.e. *DGD1* and *DGD2*. The *dgd1* mutant contained markedly less DGDG compared to WT, was pale green and had a strongly altered chloroplast structure [94]. The *dgd1* mutant showed a decreased PSII/PSI ratio. Analyses of the low-temperature chlorophyll fluorescence of thylakoid fractions suggested a strongly modified energetic interaction between the antenna and the reaction centers in both reaction centers [95]. The *dgd1* mutant also shows an uncoupling of the PSI antenna, based on the data presented in the *dgd1* mutant analysis [95]. Quantification of pigments and pigment-binding apoproteins showed an impaired stoichiometry of pigment-protein complexes. In addition, an increase in the amount of peripheral LHCII subunits relative to the inner antenna (Lhcb4 and Lhcb5) and PSII core (D1 and α -subunit of Cyt *b*₅₅₉) complexes was observed [95]. The *dgd1* × *dgd2* mutant contained only traces of DGDG, generated by a distinct pathway (possibly via the action of a galactolipid:galactolipid galactosyltransferase,

see below) and had a more severe phenotype compared to *dgd1* [96]. Functional analyses of photosynthesis in the *mgd1-1*, *dgd1* and *dgd1* × *dgd2* mutants, done by measuring transient fluorescence upon excitation with an actinic laser flash, were consistent with the idea that the small fraction of DGDG molecules left in the thylakoid membranes of the mutant was specifically bound to PSII and essential for its molecular function [86]. This fraction of DGDG is likely critical for the structure and function of PSII at its donor side. Altogether, mutant analyses show a critical role of DGDG in the structure and function of PSII from cyanobacteria to angiosperms.

- SQDG: A mutant of *Synechocystis* lacking SQDG could be obtained by *knocking out* the *sqdB* gene [97]. The *sqdB*[−] mutant showed a strong damage of PSII, but could grow photoautotrophically on SQDG-supplemented medium. This phenotype was not observed in a mutant of *sqdB* obtained in *Synechococcus* [37,97], where SQDG appeared dispensable for PSII. In a SQDG-deficient mutant of the green alga *Chlamydomonas*, PSI activity was intact whereas that of PSII was impaired, a phenotype that is rescued by addition of SQDG in the medium [98]. SQDG deficiency was deleterious at both acceptor and donor sites of PSII, and led to a higher sensitivity to the herbicide DCMU, suggesting that this lipid affects the equilibrium constant between the primary quinone acceptor Q_A and the diffusing quinone Q_B [67,98]. The higher sensitivity to DCMU was also reported in the *Synechocystis* mutant lacking SQDG [97]. In *Chlamydomonas*, SQDG was also shown to contribute to the stability of the interaction of PSII with extrinsic proteins, like in the case of DGDG (see above) [67]. In *Arabidopsis* mutants completely lacking SQDG, following the KO of *SQD1* or *SQD2*, no effect could be observed on photosynthesis, supporting that, in angiosperms, SQDG is dispensable for the structure and function of the photosynthetic machinery [34,38,67].
- PG: Mutants of *Synechocystis* lacking PG have been obtained by *knocking out* the *cdsA* (presumably encoding a cytidine 5'-diphosphate-diacylglycerol synthase) [36] or *pgsA* (encoding a phosphatidylglycerol 3-phosphate synthase) [99] genes. These mutants need a supply of PG in the medium for photoautotrophic growth. PSII activity appeared specifically altered [36,99], with phenotypic traits similar to those observed following a deficiency of SQDG: a defect in the electron transport from Q_A to Q_B [98], at the acceptor site, but also a dysfunction at the donor site, with a disassembly of extrinsic proteins from PSII [100]. In the green alga *Chlamydomonas*, a KO of the desaturase that catalyzes the synthesis of the 16:1t fatty acid, which is specifically and uniquely found in chloroplastic PG, was sufficient to prevent the assembly of the LHCII trimer [101], but a similar mutation in *Arabidopsis* did not induce

the same defect in the PSII antennas [102]. In angiosperms, the role of PG in photosynthetic membranes was initially studied by depleting PG from thylakoids isolated from *Pisum sativum* by an enzymatic treatment with a phospholipase A2 [103] or a phospholipase C [104]. In both cases, PSI appeared intact whereas the function of PSII was strongly altered. Recent work has however partially challenged this conclusion, showing that PG plays a role in protecting PSI from photodamage in tobacco plants subjected to cold stress [105].

As mentioned above, a deficiency of PG in thylakoids could not be obtained by mutating genes involved in its synthesis in *Arabidopsis*, without a very severe phenotype [44], which is consistent with a vital role of this specific lipid for the function of PSII. Consistently with their importance for chloroplast biogenesis and for the structure and function of the photosynthetic machinery, particularly at the level of PSII, it is not possible to genetically abolish the syntheses of MGDG [81] or PG [44] from cyanobacteria to angiosperms. Although DGDG null mutants could be generated in cyanobacteria [89–91], a complete deficiency of DGDG could not be obtained in angiosperms [96]. SQDG seems vital in some cyanobacteria species, but in most cases it is dispensable, playing a role under specific environmental conditions, in particular as surrogate for PG upon phosphate starvation, saving PG for its core function as a cofactor of PSII.

4. The biosynthesis of thylakoid lipids implies the cooperation of the stroma, the chloroplast envelope membranes and the endoplasmic reticulum

The demand of lipids for the expansion of photosynthetic membranes is very high. The relative proportions of MGDG, DGDG, SQDG and PG in thylakoids is close to that of the IEM [5], as shown in Table 1, highlighting the role of the IEM in the biogenesis of thylakoid membranes, using very active and coordinated lipid-synthetic machineries. From cyanobacteria to algae and angiosperms, the stroma and the envelope membranes cooperate for the biosynthesis of thylakoid lipids (for recent reviews [55,106]). The endoplasmic reticulum (ER) is also involved in eukaryotes. We shall give here an overview of this system in the chloroplast of angiosperms, and point, when necessary, differences that could occur in cyanobacteria. The identification and characterization of each individual enzyme involved in glycerolipid biosynthetic pathways in the chloroplast have relied on genetic screens, protein purifications and biochemical analyses. Our understanding of the sub-organellar compartmentalization of these pathways has benefited of the proteomic determination of each of the membrane sub-fractions using highly sensitive mass spectrometry techniques [106,107].

4.1. Origin of the building blocks for thylakoid lipids

4.1.1. *In situ* syntheses and import of precursors for the diacylglycerol moiety: fatty acids, glycerol-3-phosphate, phosphatidic acid and diacylglycerol

The biosynthesis of fatty acids, thio-esterified to acyl carrier protein (in angiosperms: 16:0-ACP and C18:0-ACP), is achieved by two enzymatic systems found in the stroma: an acetyl-CoA carboxylase complex and a dissociable fatty acid synthase of type II (FASII). Following the release of acyl-ACP by FASII, a stromal delta-9 acyl/stearoyl-ACP desaturase (FAB2) catalyzes the synthesis of 18:1-ACP from 18:0-ACP. In some photosynthetic eukaryotes, this enzyme catalyzes the desaturation of 16:0-ACP into 16:1-ACP. Fresh fatty acids can be either used in the stroma or exported to the cytosol where they are activated by CoA, thus feeding the cytosolic pool of acyl-CoAs [1,107–110].

The synthesis of glycerol-3-phosphate (G3P) can occur in the stroma by the action of a glycerol-3-phosphate dehydrogenase, using dihydroxyacetone-phosphate as a substrate. The location of

dihydroxyacetone-phosphate is thus important for the latter production of glycerolipid, possibly explaining the presence of multiple isoforms of fructose-bisphosphate aldolases in different sites of the chloroplast [107]. The proportion of G3P utilized for the biosynthesis of glycerolipids in plastids also depends on concurrent consumption for other metabolic purposes and possible shuttling via the phosphate/triose-phosphate translocator [106].

Using acyl-ACP and G3P as initial substrates, the envelope is the site of biosynthesis of phosphatidic acid (PA) and DAG, which are precursors for MGDG, DGDG, SQDG and PG [1], by the stepwise action of two acyltransferases (ATS1 in the stroma and ATS2 in the IEM), and a phosphatidic acid phosphatase (PAP in the IEM) [44] (Fig. 3, enzymes 1, 2, 3). The specificity of ATS1 and ATS2 in angiosperms leads to the production of PA and DAG with 18:1 and 16:0 at positions *sn*-1 and *sn*-2 respectively. The glycerolipids thus assembled in the plastid, with 16-carbon fatty acids at *sn*-2 position, harbor a diacyl structure known as 'prokaryotic', similar to that observed in cyanobacteria glycerolipids [1,14,24,107].

In eukaryotes, the ER is also mobilized to fulfill the very high demand of precursors for chloroplasts, in particular for galactoglycerolipids. Acyl-CoAs and G3P are thus used for the stepwise synthesis of PA within the ER, with 16:0, 18:0 or 18:1 at *sn*-1 and 18:0 or 18:1 at *sn*-2 positions. PA can then be dephosphorylated into DAG. Both PA and DAG are at the origin of all phosphoglycerolipids synthesized in the ER. Membrane glycerolipids generated in the ER, with 18-carbon acyls at *sn*-2 position, harbor a diacyl structure known as 'eukaryotic' [1,14,24,107]. Import of ER precursors in the chloroplast is reflected by the high proportion of this eukaryotic signature in galactoglycerolipids. Although this import has been known for long [111], only recent advances combining the analysis of the response of *Arabidopsis* to environmental stresses, transcriptomic studies and characterization of genetic mutants, have pinpointed some proteins involved in this import (see below).

4.1.2. *In situ* synthesis and import of precursors for the polar heads: UDP-galactose, UDP-sulfoquinovose and glycerol-3-phosphate

The assembly of thylakoid glycerolipids requires the availability of polar head precursors: G3P and cytidine-triphosphate (CTP) for the synthesis of PG, uridine-triphosphate (UTP) for the syntheses of uridine-diphospho-galactose (UDP-Gal) and -sulfoquinovose (UDP-Sq) required for MGDG, DGDG and SQDG.

- The synthesis of G3P in the stroma has been detailed above [107].
- The import of CTP and UTP could possibly operate through a nucleoside-triphosphate transporter [106].
- The precursor for UDP-sugars is UDP-glucose (UDP-Glc), which synthesis in the stroma has been demonstrated [112]. UDP-Sq is clearly generated in the stroma, from UDP-Glc [113], allowing the accumulation of this substrate for the biosynthesis of SQDG. By contrast, cytosolic UDP-Gal can be provided to the intermembrane space separating the IEM and the OEM, or directly at the surface of the OEM, since enzymes assembling MGDG and DGDG are either in the OEM or in the IEM [114–117]. An epimerase converting UDP-Glc into UDP-Gal in the stroma of rice chloroplasts was nevertheless shown essential for the biosynthesis of galactoglycerolipids [118], suggesting that the polar head of galactoglycerolipids could be synthesized using either UDP-Gal from the stroma, deriving from UDP-Glc, or cytosolic UDP-Gal.

4.2. Assembly of thylakoid lipids in the chloroplast envelope

4.2.1. Biosynthetic machineries in the chloroplast envelope

In the envelope membranes, surrounding chloroplasts of angiosperms, PA and DAG are available for the biosynthesis of lipids. They are either neosynthesized in the IEM, with a 'prokaryotic' signature (18:1/16:0), or imported from the ER and harboring a 'eukaryotic' signature (with 18-carbon acyls at the *sn*-2 position and structures containing 16:0 at the *sn*-1 position). PG can be synthesized from PA, via

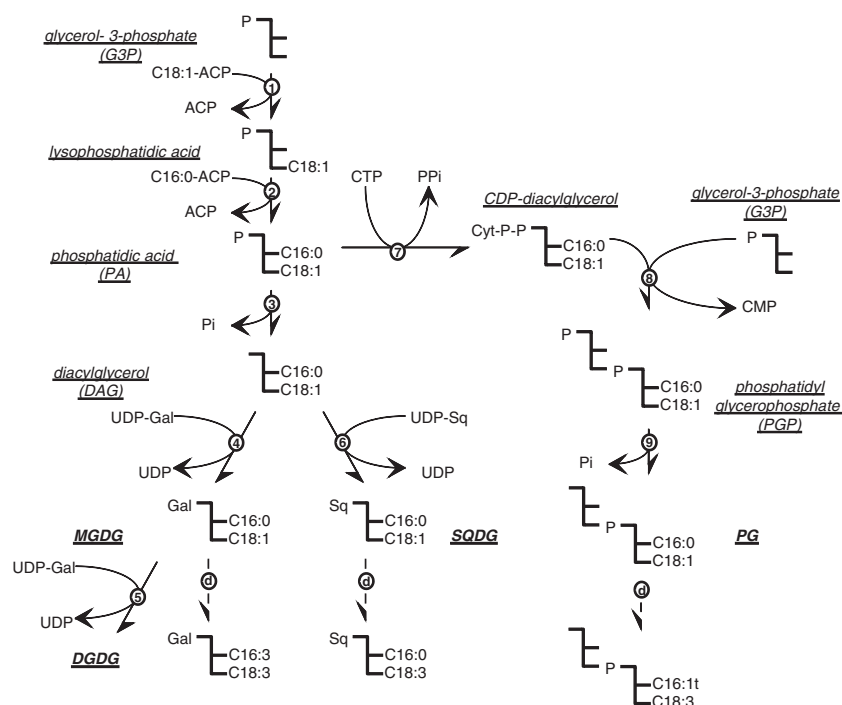


Fig. 3. Biosynthesis of thylakoid lipids in the chloroplast envelope of angiosperms. (1) *sn*-Glycerol-3-phosphate acyltransferase or *ATS1*, (2) 1-acylglycerol-phosphate acyltransferase or *ATS2*, (3) phosphatidate phosphatase, (4) MGDG synthase, (5) DGDG synthase, (6) SQDG synthase, (7) CTP:phosphatidate cytosine transferase, also called CDP-DAG synthase or *CDS*, (8) glycerol-3-phosphate:CDP-diacylglycerol phosphatidyltransferase, also called phosphatidylglycerophosphate synthase, (9) phosphatidylglycerol synthase or phosphatidylglycerol phosphate phosphatase, (d) desaturases. In cyanobacteria, a major difference occurs in the synthesis of galactolipids, by a two-step process involving a synthesis of MGLcDG followed by an epimerisation of the glucose polar head into galactose, thus forming MGDG (see text).

a CDP-DAG pathway and MGDG, DGDG and SQDG can be assembled from DAG. Nevertheless, the diacyl-moiety of each of these lipids indicates that the enzymes do not collect their substrates indistinctly in the original PA/DAG pool. A sorting of substrates is operated, leading to distinct acyl profiles in each of the lipid classes.

Fig. 3 shows the different reactions occurring in the envelope of the chloroplast, at least in angiosperms.

PG is considered as the sole phosphoglycerolipid that can be synthesized in the chloroplast envelope. In *Arabidopsis*, thylakoid PG is derived from 'prokaryotic' PA, regardless of the massive import of 'eukaryotic' precursors that might occur [119]. In at least five *Arabidopsis* allelic mutants of *ATS1*, thought to be null, a remaining leaky activity allowed the production of prokaryotic PA that was mainly used for the production of PG [44]. In the *ats1-1* leaky mutant, a RNAi repression of *ATS2* led to an interruption of the biosynthesis of PG and a very severe phenotype confirming that PG relied on the prokaryotic pathway [44]. Prokaryotic PA is thus mostly used for the stepwise biosynthesis of CDP-DAG (catalyzed by a CDP-DAG synthase or *CDS*), phosphatidylglycerophosphate or PGP (catalyzed by a PGP synthase) and eventually PG (catalyzed by a PGP phosphatase, or PGP-P) (see Fig. 3; enzymes 7, 8 and 9). PG is then substrate for a desaturase that specifically adds a double bond in *trans* conformation to 16:0 at the *sn*-2 position, leading to the presence of 16:1t [120] thought to be structurally important for the role of chloroplast PG at least in *Chlamydomonas* (see above).

Why is PG mostly synthesized from prokaryotic PA? Is the position of 16:1t essential at the *sn*-2 position? Is one of the enzymes involved in the biosynthesis of PG from PA strictly specific of a 'prokaryotic' substrate? By expressing a diacylglycerol kinase in chloroplasts of *Nicotiana tabacum*, an accumulation of eukaryotic PA, after phosphorylation of eukaryotic DAG, could be artificially promoted, and led to the accumulation of PG with eukaryotic signatures in chloroplasts [121]. In the newly formed PG, the $\Delta 3$ -*trans* double bond was also found in *cis*-unsaturated 18-carbon fatty acids at position *sn*-2. Minor effects could be observed on the function of the photosynthetic apparatus, but a significant

reduction of growth suggested that PG played more roles than those initially dissected at the level of photosynthetic membranes. Indeed, PG also acts as a positive activator of MGDG synthesis (see below) and the overexpression of a diacylglycerol kinase is likely to disturb the overall homeostasis of chloroplast lipids, leading to additional and unsuspected indirect effects. The synthesis of chloroplast PG in the diacylglycerol kinase over-expressor also indicates that the lack of eukaryotic structures in PG in the WT is not strictly due to the specificity of the enzyme catalyzing the synthesis of CDP-DAG, but rather on a channeling from PA to PG, which remains to be elucidated.

The synthesis of galactoglycerolipids is initiated by the production of MGDG in the envelope. In *Arabidopsis*, a multigenic family of 3 MGDG synthases (*MGD1*, *MGD2*, *MGD3*) [115], catalyzes the transfer of a galactosyl residue from UDP-Gal to a DAG acceptor (Fig. 3, enzyme 4). By contrast with PG, MGDG can be synthesized from prokaryotic or eukaryotic precursors. MGD enzymes are therefore at a key position to play a role in the coupling of extra-plastidial lipid metabolism with chloroplast lipid metabolism. Based on in vitro enzymatic studies, on analyses of subcellular fractions of chloroplast membranes and using GFP-fusion localization by epifluorescent microscopy [114,115,122–125], *MGD1* was shown to be the most abundant and most active MGDG synthase, localized in the IEM, and being essential for the massive expansion of thylakoids. A KO of *MGD1* (*mgd1-2*) [85], is lethal in the absence of an external source of carbon substrate [81]. *MGD2* and *MGD3* are localized in the OEM and operate under Pi shortage [115]. Genetic disruption of *MGD2* and *MGD3* genes and double *mgd2* x *mgd3* KO mutants have no striking phenotype in normal growth conditions [126], as these enzymes seem to act mostly in specific contexts like in response to phosphate starvation or in specific cell types like in elongating pollen tubes [84].

It is important to note that in cyanobacteria, MGDG is not synthesized by a homolog of MGDG synthases, but after a two-step process [127]. In cyanobacteria, MGLcDG is synthesized by transfer of a glucosyl residue from a UDP-Glc donor to a DAG acceptor [128]. The glucosyl

polar head is then massively converted into galactose by the action of an epimerase. MGDG is thus produced by very distinct enzymatic machineries in cyanobacteria and chloroplast-containing eukaryotes, raising the questions of the importance of conserving MGDG in photosynthetic membranes and of the loss of the MGLCDG synthase and evolutionary origin of MGDG synthases in eukaryotes following the primary endosymbiosis. Molecular phylogeny reconstructions support the lateral transfer of a MGDG synthase ancestral gene from a chlorobacterium ancestor [127].

In chloroplasts, part of MGDG, with a eukaryotic structure, is converted into DGDG by the action of DGDG synthases (DGD1 and DGD2 in *Arabidopsis*) [24] (Fig. 3, enzyme 5). In angiosperms, the fatty acid composition of MGDG and DGDG are different, MGDG being 16:3-rich whereas DGDG is 16:0-rich. This observation suggests that (i) FAD5 catalyzes the very rapid desaturation of 16:0 into 16:1 at position *sn*-2 of MGDG, and that (ii) 16:1- and subsequently formed 16:2- and 16:3-MGDG species are not utilized by DGD1 and DGD2.

The sulfolipid is simply produced by transfer of a sulfoquinovosyl from UDP-Sq on a DAG, by the action of an SQDG synthase, or SQD2, in *Arabidopsis* [35] (Fig. 3, enzyme 6). This enzyme was localized in the chloroplast [35], catalyzing the production of SQDG in the IEM, consistently with earlier biochemical evidence [129,130]. Recently, it was shown that in angiosperms, SQD2 could also catalyze the synthesis of glucuronosyldiacylglycerol (GlcADG), a quantitatively minor lipid that accumulate upon phosphate starvation and might play a role as surrogate for PI and/or PE [131].

4.2.2. Evidence of channeling and enzymatic regulations of the biosynthetic fluxes producing MGDG, DGDG, SQDG and PG

The establishment of a refine balance between each lipid class in thylakoid membrane requires controlling and regulatory mechanisms. Based on genetic and biochemical studies, some general guidelines can be deduced.

- First, some reactions catalyzed by apparently dissociated enzymes operate in series, with substrates captured as soon as they are produced to feed the downstream enzyme, following a process known as 'channeling'. The synthesis of PG thus appears as a channeling from prokaryotic PA to PG (prokaryotic PA \rightarrow PG) [44,119]. Likewise, the analyses of mutants, grown in various supplies of phosphate support the occurrence of a cooperation of MGD and DGD proteins with a possible DAG \rightarrow MGDG \rightarrow DGDG channeling. DGD1 (in the OEM) seems to operate downstream MGD1 (in the IEM), whereas DGD2 (in the OEM) seems to operate downstream MGD2 and MGD3 (in the OEM) following Pi deprivation [24,132].
- Second, some lipid intermediates can act as effectors of enzymes acting in the same or different lipid biosynthetic pathways. Recombinant and native MGD1 from *Arabidopsis* is thus strongly activated by very low proportions of PA, an upstream precursor in the same pathway, or by higher proportions of PG [133,134].

The different mechanisms that govern the establishment of the thylakoid lipid profile integrate transcriptional, post-translational and enzymological regulatory mechanisms, which are still poorly known [55]. Future challenges include their characterizations.

5. Lipid trafficking

The chloroplast is not isolated in the cytosol, and the cooperation of other compartments is particularly important in the overall lipid homeostasis at the cellular level. Import of eukaryotic precursors is reflected by the high proportion of eukaryotic signatures in plastid galactoglycerolipids. These imported precursors derive from non-plastidic phosphoglycerolipids. In the current understanding of this process, PA produced by phospholipases D (PLDs) might be transferred across the plastid envelope by an ABC transporter (TGD complex)

[24]. In the IEM, imported PA could then be dephosphorylated, thus generating DAG used for galactoglycerolipid syntheses. DAG produced by phospholipases C (PLCs) or endomembrane phosphatidic acid phosphatases [135], might also be transported to the plastid envelope by an unknown mechanism, but this route is currently debated. The import of PC, at least in the cytosolic leaflet of the OEM [136] might involve a lyso-PC intermediate [137,138]. The search for components of the eukaryotic pathway has benefited of the analyses of the effect of phosphate starvation on the remodeling of lipids, triggering a transient accumulation of PC, its hydrolysis and net conversion into galactoglycerolipids [139]. Study of the transcriptome of *Arabidopsis* in response to low phosphate combined with genetics have pointed genes coding for PLDs (PLD ζ 1, PLD ζ 2) and PLCs (NPC4, NPC5) and involved in the supply of precursors for MGDG (reviewed by [1,24,108]).

In addition to the TGD machinery, ER-chloroplast lipid trafficking could alternatively occur at the level of PLAM (plastid associated membranes) systems [140] or even via direct biochemical continuity between ER and plastids [141]. Other puzzling questions regarding lipid trafficking required for the biogenesis of thylakoids include lipid transfers between the IEM and the OEM, lipid lateral movements and from one leaflet to another within envelope membranes, lipid trafficking from the chloroplast to the endomembranes and mitochondrion and, eventually, lipid trafficking from the IEM to the thylakoids (for review [1,24,55,106,108]). Transport of lipids via vesicle trafficking inside plastids has been suggested in various studies [48,142–145], but has not been unambiguously demonstrated so far.

6. Conclusions and future challenges

In this review, we have shown that MGDG, DGDG, PG and SQDG have been conserved from cyanobacteria to primary plastids. The relative proportions of each lipid result from highly regulated and compartmentalized metabolic pathways. The MGDG/DGDG ratio appears critical for the appropriate structure of thylakoid membranes. The SQDG/PG and, at least in eukaryotes, the galactoglycerolipid/phosphoglycerolipid ratios are finely tuned in response to the availability of phosphate, and in relation with the cellular phosphate homeostasis. Concerning the photosynthetic function, MGDG, DGDG and PG are important stabilizing components for PSII. SQDG seems to act as a 'stand-in-actor', playing part of PG roles upon phosphate starvation. These lipids also play other roles, in particular in eukaryotes. Future challenges include the understanding of lipid metabolic pathways as a highly regulated system, the molecular characterization of lipid trafficking machineries, and the complex evolution history that has preserved these lipid classes from cyanobacteria to chloroplasts.

Acknowledgements

Authors were supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-BLAN-1524, ReGal; ANR-12-BIME-0005, DiaDomOil; ANR-12-JCJC, ChloroMitoLipid), Région Rhône-Alpes and by the Labex GRAL (Grenoble Alliance for Integrated Structural Cell Biology). Authors wish to thank reviewers for their valuable comments to improve this manuscript.

References

- [1] J. Jouhet, E. Marechal, M.A. Block, Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells, *Progr. Lipid Res.* 46 (2007) 37–55.
- [2] R. Douce, J. Joyard, Biochemistry and function of the plastid envelope, *Annu. Rev. Cell Biol.* 6 (1990) 173–216.
- [3] M.A. Block, R. Douce, J. Joyard, N. Rolland, Chloroplast envelope membranes: a dynamic interface between plastids and the cytosol, *Photosynth. Res.* 92 (2007) 225–244.
- [4] L. Mendiola-Morgenthaler, W. Eichenberger, A. Boschetti, Isolation of chloroplast envelopes from *Chlamydomonas*. Lipid and polypeptide composition, *Plant Sci.* 41 (1985) 97–104.
- [5] M.A. Block, A.J. Dorne, J. Joyard, R. Douce, Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. 2. Biochemical characterization, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 3281–3286.

- [6] R. Douce, C. Alban, R. Bligny, M.A. Block, J. Coves, A.J. Dorne, E.P. Journet, J. Joyard, M. Neuburger, F. Rebeillé, Lipid distribution and synthesis within the plant cell, in: P.K. Stumpf, J.B. Mudd, W.D. Nes (Eds.), *The Metabolism, Structure and Function of Plant Lipids*, Plenum Publishing Corporation, 1986, pp. 255–263.
- [7] C.F. Allen, P. Good, H.F. Davies, S.D. Foxler, Plant and chloroplast lipids. I – Separation and composition of major spinach lipids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1964) 424–430.
- [8] C.F. Allen, O. Hirayama, P. Good, Lipid composition in photosynthetic systems, in: T.W. Goodwin (Ed.), *Biochemistry of Chloroplasts*, vol. 1, Academic Press, London, 1966, pp. 195–200.
- [9] K. Gounaris, J. Barber, Monogalactosyldiacylglycerol – the most abundant polar lipid in nature, *Trends Biochem. Sci.* 8 (1983) 378–381.
- [10] S. Mongrand, J.J. Bessoule, F. Cabantous, C. Cassagne, The C-16:3/C-18:3 fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species, *Phytochem.* 49 (1998) 1049–1064.
- [11] F. Domergue, A. Abbadi, U. Zahring, H. Moreau, E. Heinz, In vivo characterization of the first acyl-CoA Delta6-desaturase from a member of the plant kingdom, the microalga *Ostreococcus tauri*, *Biochem. J.* 389 (2005) 483–490.
- [12] F. Domergue, P. Spiekermann, J. Lerchl, C. Beckmann, O. Kilian, P.G. Kroth, W. Boland, U. Zahring, E. Heinz, New insight into *Phaeodactylum tricornutum* fatty acid metabolism. Cloning and functional characterization of plastidial and microsomal delta12-fatty acid desaturases, *Plant Physiol.* 131 (2003) 1648–1660.
- [13] A. van Besouw, J.F. Wintermans, Galactolipid formation in chloroplast envelopes. I. Evidence for two mechanisms in galactosylation, *Biochim. Biophys. Acta* 529 (1978) 44–53.
- [14] E. Heinz, P.G. Roughan, Similarities and differences in lipid metabolism of chloroplasts isolated from 18:3 and 16:3 plants, *Plant Physiol.* 72 (1983) 273–279.
- [15] J.W.M. Heemskerk, J.F.G.M. Wintermans, J. Joyard, M.A. Block, A.J. Dorne, R. Douce, Localization of galactolipid–galactolipid galactosyltransferase and acyltransferase in outer envelope membrane of spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* 877 (1986) 281–289.
- [16] E.R. Moellering, B. Muthan, C. Benning, Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane, *Science* 330 (2010) 226–228.
- [17] E.R. Moellering, C. Benning, Galactoglycerolipid metabolism under stress: a time for remodeling, *Trends Plant Sci.* 16 (2011) 98–107.
- [18] B.A.S. Van Mooy, H.F. Fredricks, B.E. Pedler, S.T. Dyhrman, D.M. Karl, M. Kobizek, M.W. Lomas, T.J. Mincer, L.R. Moore, T. Moutin, M.S. Rappe, E.A. Webb, Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity, *Nature* 458 (2009) 69–72.
- [19] H. Hartel, P. Dormann, C. Benning, DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 10649–10654.
- [20] H. Tjellstrom, M.X. Andersson, K.E. Larsson, A.S. Sandelius, Membrane phospholipids as a phosphate reserve: the dynamic nature of phospholipid-to-digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants, *Plant Cell Environ.* 31 (2008) 1388–1398.
- [21] M.X. Andersson, K.E. Larsson, H. Tjellstrom, C. Liljeborg, A.S. Sandelius, The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 27578–27586.
- [22] J. Jouhet, E. Marechal, B. Baldan, R. Bligny, J. Joyard, M.A. Block, Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria, *J. Cell Biol.* 167 (2004) 863–874.
- [23] C. Benning, A role for lipid trafficking in chloroplast biogenesis, *Progr. Lipid Res.* 47 (2008) 381–389.
- [24] C. Benning, Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25 (2009) 71–91.
- [25] S. Dhondt, P. Geoffroy, B.A. Stelmach, M. Legrand, T. Heitz, Soluble phospholipase A2 activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes, *Plant J.* 23 (2000) 431–440.
- [26] A. Andreou, F. Brodhun, I. Feussner, Biosynthesis of oxylipins in non-mammals, *Progr. Lipid Res.* 48 (2009) 148–170.
- [27] U. Lion, T. Wiesemeier, F. Weinberger, J. Beltran, V. Flores, S. Faugeron, J. Correa, G. Pohnert, Phospholipases and galactolipases trigger oxylipin-mediated wound-activated defence in the red alga *Gracilaria chilensis* against epiphytes, *Chembiochem* 7 (2006) 457–462.
- [28] A. Ibrahim, A.L. Schütz, J.M. Galano, C. Herrfurth, K. Feussner, T. Durand, F. Brodhun, I. Feussner, The alphabet of galactolipids in *Arabidopsis thaliana*, *Front. Plant Sci.* 2 (2011).
- [29] H.S. Vu, P. Tamura, N.A. Galeva, R. Chaturvedi, M.R. Roth, T.D. Williams, X. Wang, J. Shah, R. Welti, Direct infusion mass spectrometry of oxylipin-containing *Arabidopsis* membrane lipids reveals varied patterns in different stress responses, *Plant Physiol.* 158 (2012) 324–339.
- [30] A.A. Benson, H. Daniel, R. Wiser, A sulfolipid in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 45 (1959) 1582–1587.
- [31] A.A. Benson, The plant sulfolipid, *Adv. Lipid Res.* 1 (1963) 387–394.
- [32] H. Budzikie, J. Rullkott, E. Heinz, Mass-spectrometric investigation of glycosyl glycerides, *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* 28 (1973) 499–504.
- [33] D.A. Gage, Z.H. Huang, C. Benning, Comparison of sulfoquinovosyl diacylglycerol from spinach and the purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* by fast atom bombardment tandem mass spectrometry, *Lipids* 27 (1992) 632–636.
- [34] M. Shimajima, Biosynthesis and functions of the plant sulfolipid, *Progr. Lipid Res.* 50 (2011) 234–239.
- [35] B. Yu, C.C. Xu, C. Benning, *Arabidopsis* disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 5732–5737.
- [36] N. Sato, M. Hagio, H. Wada, M. Tsuzuki, Requirement of phosphatidylglycerol for photosynthetic function in thylakoid membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 10655–10660.
- [37] S. Guler, A. Seeliger, H. Hartel, G. Renger, C. Benning, A null mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942 deficient in the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 7501–7507.
- [38] B. Essigmann, S. Guler, R.A. Narang, D. Linke, C. Benning, Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 1950–1955.
- [39] H. Hartel, B. Essigmann, H. Lokstein, S. Hoffmann-Benning, M. Peters-Kottig, C. Benning, The phospholipid-deficient pho1 mutant of *Arabidopsis thaliana* is affected in the organization, but not in the light acclimation, of the thylakoid membrane, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1415 (1998) 205–218.
- [40] C. Benning, J.T. Beatty, R.C. Prince, C.R. Somerville, The sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol is not required for photosynthetic electron-transport in *Rhodospirillum rubrum* but enhances growth under phosphate limitation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 1561–1565.
- [41] N. Sato, Roles of the acidic lipids sulfoquinovosyl diacylglycerol and phosphatidylglycerol in photosynthesis: their specificity and evolution, *J. Plant Res.* 117 (2004) 495–505.
- [42] B. Yu, C. Benning, Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in *Arabidopsis*, *Plant J.* 36 (2003) 762–770.
- [43] H. Wada, M. Murata, The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis, *Photosynth. Res.* 92 (2007) 205–215.
- [44] C.C. Xu, B. Yu, A.J. Cornish, J.E. Froehlich, C. Benning, Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of *Arabidopsis* mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3-phosphate acyltransferase, *Plant J.* 47 (2006) 296–309.
- [45] M. Hagio, I. Sakurai, S. Sato, T. Kato, S. Tabata, H. Wada, Phosphatidylglycerol is essential for the development of thylakoid membranes in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.* 43 (2002) 1456–1464.
- [46] E. Babiychuk, F. Muller, H. Eubel, H.P. Braun, M. Frentzen, S. Kushnir, *Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function, *Plant J.* 33 (2003) 899–909.
- [47] A.J. Dorne, J. Joyard, R. Douce, Do thylakoids really contain phosphatidylcholine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 71–74.
- [48] M.X. Andersson, J.M. Kjellberg, A.S. Sandelius, Chloroplast biogenesis. Regulation of lipid transport to the thylakoid in chloroplasts isolated from expanding and fully expanded leaves of pea, *Plant Physiol.* 127 (2001) 184–193.
- [49] M. Terashima, M. Specht, B. Naumann, M. Hippler, Characterizing the anaerobic response of *Chlamydomonas reinhardtii* by quantitative proteomics, *Mol. Cell. Proteomics* 9 (2010) 1514–1532.
- [50] J. Fan, C. Yan, C. Andre, J. Shanklin, J. Schwender, C. Xu, Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell Physiol.* 53 (2012) 1380–1390.
- [51] J. Fan, C. Andre, C. Xu, A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*, *FEBS Lett.* 585 (2011) 1985–1991.
- [52] M. Tevini, D. Steinmüller, Composition and function of plastoglobuli, *Planta* 163 (1985) 91–96.
- [53] C. Brehelin, F. Kessler, The plastoglobule: a bag full of lipid biochemistry tricks, *Photochem. Photobiol.* 84 (2008) 1388–1394.
- [54] F. Kessler, P.A. Vidi, Plastoglobule lipid bodies: their functions in chloroplasts and their potential for applications, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 107 (2007) 153–172.
- [55] L. Boudière, C. Botte, N. Saidani, M. Lajoie, J. Marion, L. Bréhélin, Y. Yamayo-Botté, B. Satiat-Jeuemaitre, C. Breton, A. Girard-Egrot, O. Bastien, J. Jouhet, D. Falconet, M.A. Block, E. Maréchal, Galvestine-1, a novel chemical probe for the study of the glycerolipid homeostasis system in plant cells, *Mol. Biosyst.* 287 (2012) 22367–22376.
- [56] B.D. Bruce, The role of lipids in plastid protein transport, *Plant Mol. Biol.* 38 (1998) 223–246.
- [57] W.S. Chow, E.H. Kim, P. Horton, J.M. Anderson, Grana stacking of thylakoid membranes in higher plant chloroplasts: the physicochemical forces at work and the functional consequences that ensue, *Photochem. Photobiol. Sci.* 4 (2005) 1081–1090.
- [58] G. Finazzi, F. Rappaport, A. Furia, M. Fleischmann, J.D. Rochaix, F. Zito, G. Forti, Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*, *EMBO Rep.* 3 (2002) 280–285.
- [59] J.D. Rochaix, Regulation of photosynthetic electron transport, *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2011) 375–383.
- [60] M. Iwai, Y. Takahashi, J. Minagawa, Molecular remodeling of photosystem II during state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell* 20 (2008) 2177–2189.
- [61] J. Minagawa, State transitions – the molecular remodeling of photosynthetic supercomplexes that controls energy flow in the chloroplast, *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2011) 897–905.
- [62] L.N. Liu, S. Scheuring, Investigation of photosynthetic membrane structure using atomic force microscopy, *Trends Plant Sci.* 18 (2013) 277–286.
- [63] S. Haferkamp, W. Haase, A.A. Pascal, H. van Amerongen, H. Kirchhoff, Efficient light harvesting by photosystem II requires an optimized protein packing density in Grana thylakoids, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 17020–17028.
- [64] H. Kirchhoff, Structural constraints for protein repair in plant photosynthetic membranes, *Plant Signal. Behav.* 8 (2013) e23634.
- [65] H. Kirchhoff, S. Haferkamp, J.F. Allen, D.B. Epstein, C.W. Mullineaux, Protein diffusion and macromolecular crowding in thylakoid membranes, *Plant Physiol.* 146 (2008) 1571–1578.
- [66] H. Kirchhoff, Molecular crowding and order in photosynthetic membranes, *Trends Plant Sci.* 13 (2008) 201–207.

- [67] N. Mizusawa, H. Wada, The role of lipids in photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta* 1817 (2012) 194–208.
- [68] B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, J. Biesiadka, Lipids in photosystem II: interactions with protein and cofactors, *Biochim. Biophys. Acta* 1767 (2007) 509–519.
- [69] E. Schleiff, J. Soll, M. Kuchler, W. Kuhlbrandt, R. Harrer, Characterization of the translocon of the outer envelope of chloroplasts, *J. Cell Biol.* 160 (2003) 541–551.
- [70] D. Seigneurin-Berny, N. Rolland, A.J. Dorne, J. Joyard, Sulfolipid is a potential candidate for annexin binding to the outer surface of chloroplast, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272 (2000) 519–524.
- [71] B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, J. Biesiadka, Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II, *Nature* 438 (2005) 1040–1044.
- [72] A. Guskov, J. Kern, A. Gabdulkhakov, M. Broser, A. Zouni, W. Saenger, Cyanobacterial photosystem II at 2.9 Å — a resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 334–342.
- [73] Y. Umena, K. Kawakami, J.R. Shen, N. Kamiya, Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, *Nature* 473 (2011) 55–60.
- [74] I. Sakurai, J.R. Shen, J. Leng, S. Ohashi, M. Kobayashi, H. Wada, Lipids in oxygen-evolving photosystem II complexes of cyanobacteria and higher plants, *J. Biochem.* 140 (2006) 201–209.
- [75] Z. Liu, H. Yan, K. Wang, T. Kuang, J. Zhang, L. Gui, X. An, W. Chang, Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution, *Nature* 428 (2004) 287–292.
- [76] P. Jordan, P. Fromme, H.T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauss, Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature* 411 (2001) 909–917.
- [77] G. Kurisu, H. Zhang, J.L. Smith, W.A. Cramer, Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity, *Science* 302 (2003) 1009–1014.
- [78] D. Stroebel, Y. Choquet, J.L. Popot, D. Picot, An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex, *Nature* 426 (2003) 413–418.
- [79] C. Breyton, C. Tribet, J. Olive, J.P. Dubacq, J.L. Popot, Dimer to monomer conversion of the cytochrome b6 f complex. Causes and consequences, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 21892–21900.
- [80] P. Jarvis, P. Dormann, C.A. Peto, J. Lutes, C. Benning, J. Chory, Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the Arabidopsis MGD synthase 1 mutant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 8175–8179.
- [81] K. Kobayashi, H. Fukuda, S. Baba, M. Kondo, M. Nishimura, K. Takamiya, H. Ohta, Identification and characterization of a MGD1 knockout mutant in Arabidopsis, *Plant Cell Physiol.* 47 (2006) S32–S.
- [82] K. Kobayashi, K. Awai, K. Takamiya, H. Ohta, Arabidopsis type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation, *Plant Physiol.* 134 (2004) 640–648.
- [83] K. Kobayashi, Y. Nakamura, H. Ohta, Type A and type B monogalactosyldiacylglycerol synthases are spatially and functionally separated in the plastids of higher plants, *Plant Physiol. Biochem.* 47 (2009) 518–525.
- [84] C.Y. Botte, M. Deligny, A. Roccia, A.L. Bonneau, N. Saidani, H. Hardre, S. Aci, Y. Yamaro-Butte, J. Jouhet, E. Dubots, K. Loizeau, O. Bastien, L. Brehelin, J. Joyard, J.C. Cintrat, D. Falconet, M.A. Block, B. Rousseau, R. Lopez, E. Marechal, Chemical inhibitors of monogalactosyldiacylglycerol synthases in *Arabidopsis thaliana*, *Nat. Chem. Biol.* 7 (2011) 834–842.
- [85] K. Kobayashi, M. Kondo, H. Fukuda, M. Nishimura, H. Ohta, Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 17216–17221.
- [86] R. Steffen, A.A. Kelly, J. Huyer, P. Dormann, G. Renger, Investigations on the reaction pattern of photosystem II in leaves from *Arabidopsis thaliana* wild type plants and mutants with genetically modified lipid content, *Biochemistry* 44 (2005) 3134–3142.
- [87] H. Aronsson, M.A. Schottler, A.A. Kelly, C. Sundqvist, P. Dormann, S. Karim, P. Jarvis, Monogalactosyldiacylglycerol deficiency in Arabidopsis affects pigment composition in the prolamellar body and impairs thylakoid membrane energization and photoprotection in leaves, *Plant Physiol.* 148 (2008) 580–592.
- [88] H. Aronsson, The galactolipid monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) contributes to photosynthesis-related processes in Arabidopsis thaliana, *Plant Signal. Behav.* 3 (2008) 1093–1095.
- [89] N. Mizusawa, S. Sakata, I. Sakurai, N. Sato, H. Wada, Involvement of digalactosyldiacylglycerol in cellular thermotolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Arch. Microbiol.* 191 (2009) 595–601.
- [90] N. Mizusawa, I. Sakurai, N. Sato, H. Wada, Lack of digalactosyldiacylglycerol increases the sensitivity of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to high light stress, *FEBS Lett.* 583 (2009) 718–722.
- [91] I. Sakurai, N. Mizusawa, H. Wada, N. Sato, Digalactosyldiacylglycerol is required for stabilization of the oxygen-evolving complex in photosystem II, *Plant Physiol.* 145 (2007) 1361–1370.
- [92] J.L. Roose, K.M. Wegener, H.B. Pakrasi, The extrinsic proteins of photosystem II, *Photosynth. Res.* 92 (2007) 369–387.
- [93] F. Facchinelli, M. Pribil, U. Oster, N.J. Ebert, D. Bhattacharya, D. Leister, A.P. Weber, Proteomic analysis of the *Cyanophora paradoxa* muroplast provides clues on early events in plastid endosymbiosis, *Planta* 237 (2013) 637–651.
- [94] P. Dormann, S. Hoffmannbenning, I. Balbo, C. Benning, Isolation and characterization of an Arabidopsis mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol, *Plant Cell* 7 (1995) 1801–1810.
- [95] H. Hartel, H. Lokstein, P. Dormann, B. Grimm, C. Benning, Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient dgd1 mutant of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.* 115 (1997) 1175–1184.
- [96] A.A. Kelly, J.E. Froehlich, P. Dormann, Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes DGD1 and DGD2 in Arabidopsis reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis, *Plant Cell* 15 (2003) 2694–2706.
- [97] M. Aoki, N. Sato, A. Meguro, M. Tsuzuki, Differing involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in photosystem II in two species of unicellular cyanobacteria, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 685–693.
- [98] A. Minoda, N. Sato, H. Nozaki, K. Okada, H. Takahashi, K. Sonoike, M. Tsuzuki, Role of sulfoquinovosyl diacylglycerol for the maintenance of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 2353–2358.
- [99] M. Hagio, Z. Gombos, Z. Varkonyi, K. Masamoto, N. Sato, M. Tsuzuki, H. Wada, Direct evidence for requirement of phosphatidylglycerol in photosystem II of photosynthesis, *Plant Physiol.* 124 (2000) 795–804.
- [100] I. Sakurai, N. Mizusawa, S. Ohashi, M. Kobayashi, H. Wada, Effects of the lack of phosphatidylglycerol on the donor side of photosystem II, *Plant Physiol.* 144 (2007) 1336–1346.
- [101] G. Dubertret, A. Mirshahi, M. Mirshahi, C. Gerard-Hirne, A. Tremolieres, Evidence from in vivo manipulations of lipid composition in mutants that the delta 3-trans-hexadecenoic acid-containing phosphatidylglycerol is involved in the biogenesis of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eur. J. Biochem.* 226 (1994) 473–482.
- [102] P. McCourt, L. Kunst, J. Browse, C.R. Somerville, The effects of reduced amounts of lipid unsaturation on chloroplast ultrastructure and photosynthesis in a mutant of *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 84 (1987) 353–360.
- [103] B.R. Jordan, W.S. Chow, A.J. Baker, The role of phospholipids in the molecular organization of pea chloroplast membranes — effect of phospholipid depletion on photosynthetic activities, *Biochim. Biophys. Acta* 725 (1983) 77–86.
- [104] M. Droppa, G. Horvath, E. Hideg, T. Farkas, The role of phospholipids in regulating photosynthetic electron transport activities: treatment of thylakoids with phospholipase C, *Photosynth. Res.* 46 (1995) 287–293.
- [105] A.G. Ivanov, S.I. Allakhverdiev, N.P. Huner, N. Murata, Genetic decrease in fatty acid unsaturation of phosphatidylglycerol increased photoinhibition of photosystem I at low temperature in tobacco leaves, *Biochim. Biophys. Acta* 1817 (2012) 1374–1379.
- [106] N. Rolland, G. Curien, G. Finazzi, M. Kuntz, E. Marechal, M. Matringe, S. Ravanel, D. Seigneurin-Berny, The biosynthetic capacities of the plastids and integration between cytoplasmic and chloroplast processes, *Annu. Rev. Genet.* 46 (2012) 233–264.
- [107] J. Joyard, M. Ferro, C. Masselon, D. Seigneurin-Berny, D. Salvi, J. Garin, N. Rolland, Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism, *Progr. Lipid Res.* 49 (2010) 128–158.
- [108] J. Jouhet, E. Dubots, E. Maréchal, M.A. Block, Lipid trafficking in plant photosynthetic cells, in: H. Wada, N. Murata (Eds.), *Lipids in Photosynthesis*, vol. 30, Springer, Dordrecht, 2010, pp. 349–372.
- [109] A.P. Brown, A.R. Slabas, J.B. Rafferty, Fatty acid biosynthesis in plants — metabolic pathways, structure and organization, in: H. Wada, N. Murata (Eds.), *Lipids in Photosynthesis*, vol. 30, Springer, Dordrecht, 2010, pp. 11–34.
- [110] Y. Li-Beisson, B. Shorrosh, F. Beisson, M.X. Andersson, V. Arondel, P.D. Bates, S. Baud, D. Bird, A. DeBono, T.P. Durrett, R.B. Franke, I.A. Graham, K. Katayama, A.A. Kelly, T. Larson, J.E. Markham, M. Miquel, I. Molina, I. Nishida, O. Rowland, L. Samuels, K.M. Schmid, H. Wada, R. Welti, C. Xu, R. Zallot, J. Ohlrogge, Acyl-lipid metabolism, *The Arabidopsis Book*, vol. 8, The American Society of Plant Biologists, Washington, 2010, pp. 1–65.
- [111] J. Ohlrogge, J. Browse, Lipid biosynthesis, *Plant Cell* 7 (1995) 957–970.
- [112] M. Shimojima, S. Hoffmann-Benning, R.M. Garavito, C. Benning, R.M. Garavito, C. Benning, Ferredoxin-dependent glutamate synthase moonlights in plant sulfolipid biosynthesis by forming a complex with SQD1, *Arch. Biochem. Biophys.* 436 (2005) 206–214.
- [113] M. Shimojima, C. Benning, Native uridine 5'-diphosphate-sulfoquinovose synthase, SQD1, from spinach purifies as a 250-kDa complex, *Arch. Biochem. Biophys.* 413 (2003) 123–130.
- [114] C. Mieg, E. Marechal, M. Shimojima, K. Awai, M.A. Block, H. Ohta, K. Takamiya, R. Douce, J. Joyard, Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG, *Eur. J. Biochem.* 265 (1999) 990–1001.
- [115] K. Awai, E. Marechal, M.A. Block, D. Brun, T. Masuda, H. Shimada, K. Takamiya, H. Ohta, J. Joyard, Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 10960–10965.
- [116] C.C. Xu, J. Fan, J.E. Froehlich, K. Awai, C. Benning, Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in Arabidopsis, *Plant Cell* 17 (2005) 3094–3110.
- [117] N.R. Hofmann, S.M. Theg, Chloroplast outer membrane protein targeting and insertion, *Trends Plant Sci.* 10 (2005) 450–457.
- [118] C. Li, Y. Wang, L. Liu, Y. Hu, F. Zhang, S. Mergen, G. Wang, M.R. Schlappi, C. Chu, A rice plastidial nucleotide sugar epimerase is involved in galactolipid biosynthesis and improves photosynthetic efficiency, *PLoS Genet.* 7 (2011) e1002196.
- [119] J. Browse, N. Warwick, C.R. Somerville, C.R. Slack, Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the 16–3 plant *Arabidopsis thaliana*, *Biochem. J.* 235 (1986) 25–31.
- [120] F. Haverkate, L.L. van Deenen, Isolation and chemical characterization of phosphatidyl glycerol from spinach leaves, *Biochim. Biophys. Acta* 106 (1965) 78–92.
- [121] M. Fritz, H. Lokstein, D. Hackenberg, R. Welti, M. Roth, U. Zahring, M. Fulda, W. Hellmeyer, C. Ott, F.P. Wolter, E. Heinz, Channeling of eukaryotic diacylglycerol into the biosynthesis of plastidial phosphatidylglycerol, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 4613–4625.
- [122] E. Marechal, M.A. Block, J. Joyard, R. Douce, Purification of UDP-galactose-1,2-diacylglycerol galactosyltransferase from spinach chloroplast envelope membranes, *C. R. Acad. Sci. III* 313 (1991) 521–528.

- [123] E. Marechal, M.A. Block, J. Joyard, R. Douce, Comparison of the kinetic properties of MGDG synthase in mixed micelles and in envelope membranes from spinach chloroplast, *FEBS Lett.* 352 (1994) 307–310.
- [124] E. Marechal, M.A. Block, J. Joyard, R. Douce, Kinetic properties of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 5788–5798.
- [125] E. Marechal, C. Mège, M.A. Block, R. Douce, J. Joyard, The catalytic site of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. Biochemical analysis of the structure and of the metal content, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 5714–5722.
- [126] K. Kobayashi, K. Awai, M. Nakamura, A. Nagatani, T. Masuda, H. Ohta, Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation, *Plant J.* 57 (2009) 322–331.
- [127] Y. Yuzawa, H. Nishihara, T. Haraguchi, S. Masuda, M. Shimajima, A. Shimoyama, H. Yuasa, N. Okada, H. Ohta, Phylogeny of galactolipid synthase homologs together with their enzymatic analyses revealed a possible origin and divergence time for photosynthetic membrane biogenesis, *DNA Res.* 19 (2012) 91–102.
- [128] K. Awai, T. Kakimoto, C. Awai, T. Kaneko, Y. Nakamura, K. Takamiya, H. Wada, H. Ohta, Comparative genomic analysis revealed a gene for monoglucosyldiacylglycerol synthase, an enzyme for photosynthetic membrane lipid synthesis in cyanobacteria, *Plant Physiol.* 141 (2006) 1120–1127.
- [129] U. Seifert, E. Heinz, Enzymatic characteristics of UDP-sulfoquinovose diacylglycerol sulfoquinovosyltransferase from chloroplast envelopes, *Bot. Acta* 105 (1992) 197–205.
- [130] C. Tietje, E. Heinz, Uridine-diphospho-sulfoquinovose: diacylglycerol sulfoquinovosyltransferase activity is concentrated in the inner membrane of chloroplast envelopes, *Planta* 206 (1998) 72–78.
- [131] Y. Okazaki, H. Otsuki, T. Narisawa, M. Kobayashi, S. Sawai, Y. Kamide, M. Kusano, T. Aoki, M.Y. Hirai, K. Saito, A new class of plant lipid is essential for protection against phosphorus depletion, *Nat. Commun.* 4 (2013) 1510.
- [132] C. Benning, H. Ohta, Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 2397–2400.
- [133] E. Dubots, M. Audry, Y. Yamaryo, O. Bastien, H. Ohta, E. Marechal, M.A. Block, Activation of the chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase, MGD1, by phosphatidic acid and phosphatidylglycerol, *J. Biol. Chem.* (2010) 6003–6011.
- [134] E. Dubots, C. Botté, L. Boudière, Y. Yamaryo-Botté, J. Jouhet, E. Maréchal, M.A. Block, Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis, *Biochimie* 94 (2012) 86–93.
- [135] Y. Nakamura, R. Koizumi, G. Shui, M. Shimajima, M.R. Wenk, T. Ito, H. Ohta, Arabidopsis lipins mediate eukaryotic pathway of lipid metabolism and cope critically with phosphate starvation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 20978–20983.
- [136] A.J. Dorne, J. Joyard, M.A. Block, R. Douce, Localization of phosphatidylcholine in outer envelope membrane of spinach-chloroplasts, *J. Cell Biol.* 100 (1985) 1690–1697.
- [137] S. Mongrand, C. Cassagne, J.J. Bessoule, Import of lyso-phosphatidylcholine into chloroplasts likely at the origin of eukaryotic plastidial lipids, *Plant Physiol.* 122 (2000) 845–852.
- [138] S. Mongrand, J.J. Bessoule, C. Cassagne, A re-examination in vivo of the phosphatidylcholine–galactolipid metabolic relationship during plant lipid biosynthesis, *Biochem. J.* 327 (Pt. 3) (1997) 853–858.
- [139] J. Jouhet, E. Marechal, R. Bligny, J. Joyard, M.A. Block, Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation, *FEBS Lett.* 544 (2003) 63–68.
- [140] M.X. Andersson, M. Goksor, A.S. Sandelius, Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact sites between endoplasmic reticulum and chloroplasts, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 1170–1174.
- [141] P. Mehrshahi, G. Stefano, J.M. Andaloro, F. Brandizzi, J.E. Froehlich, D. Dellapenna, Transorganellar complementation redefines the biochemical continuity of endoplasmic reticulum and chloroplasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 12126–12131.
- [142] M. Rantfors, I. Evertsson, J.M. Kjellberg, A.S. Sandelius, Intrplastidial lipid trafficking: regulation of galactolipid release from isolated chloroplast envelope, *Physiol. Plant.* 110 (2000) 262–270.
- [143] C. Garcia, N.Z. Khan, U. Nannmark, H. Aronsson, The chloroplast protein CPSA1, dually localized in the stroma and the inner envelope membrane, is involved in thylakoid biogenesis, *Plant J.* 63 (2010) 73–85.
- [144] N.Z. Khan, E. Lindquist, H. Aronsson, New putative chloroplast vesicle transport components and cargo proteins revealed using a bioinformatics approach: an Arabidopsis model, *PLoS One* 8 (2013) e59898.
- [145] S. Westphal, J. Soll, U.C. Voithknecht, A vesicle transport system inside chloroplasts, *FEBS Lett.* 506 (2001) 257–261.

Cite this: *Mol. BioSyst.*, 2012, **8**, 2023–2035

www.rsc.org/molecularbiosystems

REVIEW

Galvestine-1, a novel chemical probe for the study of the glycerolipid homeostasis system in plant cells

Laurence Boudière,^a Cyrille Y. Botté,^a Nadia Saidani,^a Mathieu Lajoie,^b Jessica Marion,^c Laurent Bréhélin,^b Yoshiki Yamaryo-Botté,^a Béatrice Satiat-Jeunemaître,^c Christelle Breton,^d Agnès Girard-Egrot,^e Olivier Bastien,^a Juliette Jouhet,^a Denis Falconet,^a Maryse A. Block^a and Eric Maréchal^{*a}

Received 1st March 2012, Accepted 20th April 2012

DOI: 10.1039/c2mb25067e

Plant cells are characterized by the presence of chloroplasts, membrane lipids of which contain up to ~80% mono- and digalactosyldiacylglycerol (MGDG and DGDG). The synthesis of MGDG in the chloroplast envelope is essential for the biogenesis and function of photosynthetic membranes, is coordinated with lipid metabolism in other cell compartments and is regulated in response to environmental factors. Phenotypic analyses of *Arabidopsis* using the recently developed specific inhibitor called galvestine-1 complete previous analyses performed using various approaches, from enzymology, cell biology to genetics. This review details how this probe could be beneficial to study the lipid homeostasis system at the whole cell level and highlights connections between MGDG synthesis and *Arabidopsis* flower development.

1. Introduction

In eukaryotic cells, each subcellular membrane compartment is characterized by a specific composition of different polar lipids, including glycerolipids (Fig. 1a), proportions of which are adjusted in response to various developmental, physiological or environmental changes. The glycerolipid status of a membrane, also called glycerolipid profile, is therefore a steady-state resulting from the activity of proteins involved in *de novo* syntheses of lipids, their inter-conversions by acyl- or polar head-exchanges and their movements within and between membranes. Taken together as a *system* at the whole cell level, the complex network of lipid synthesis, conversion and traffic is orchestrated by: (1) the regulation of the corresponding gene expression levels (analyzed by genetics and transcriptomics); (2) the regulation of protein stability, turnover, and post-translational modifications (proteomics); (3) the regulation of enzymatic activities *via* conventional feedback and regulatory loops (enzymology and metabolomics); and

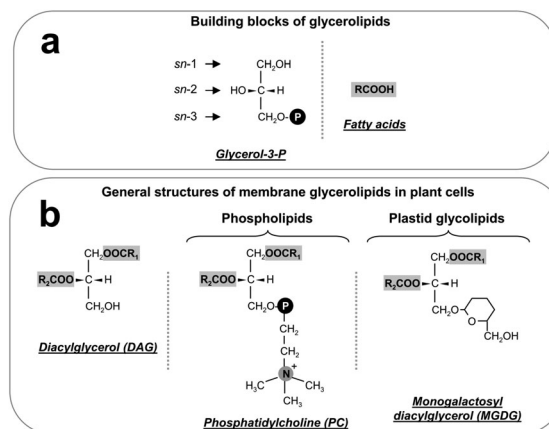


Fig. 1 (a) Building block of glycerolipids. Glycerolipids consist of a glycerol scaffold originating from glycerol-3-phosphate (glycerol-3-P), esterified at positions *sn*-1 and *sn*-2 by two fatty acids (RCOOH), provided by acyl-ACP in the stroma of plastids or acyl-CoA in the cytosol. *sn*, stereospecific numbering. (b) Illustration of the general structures of membrane glycerolipids in plant cells. The simplest structure, *i.e.* diacylglycerol (DAG), is shown on the left. Phospholipids comprise glycerolipids with a phosphated polar head, like phosphatidylcholine (PC). Plants are characterized by the presence of non-phosphated glycolipids, synthesized in the plastid membrane, like monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), illustrated on the right.

^a Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, UMR 5168 CNRS-CEA-INRA-Université J. Fourier Grenoble 1, Grenoble, France. E-mail: eric.marechal@cea.fr; Fax: +33 43878-5091; Tel: +33 43878-4985

^b Laboratoire d'Informatique, de Robotique et de Microélectronique de Montpellier, LIRMM-CNRS, Montpellier, France

^c Institut des Sciences du Végétal CNRS, Gif-sur-Yvette, France

^d Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, CERMAV CNRS-Université J. Fourier Grenoble 1, Grenoble, France

^e Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, UMR 5246 CNRS-INSU Lyon-Université Lyon 1 - CPE Lyon, Villeurbanne, France

eventually (4) the regulation of protein location, since the membrane lipid metabolism is highly dependent on the co-location of enzymes and/or transporters and their lipidic substrates (cell biology and organellar proteomics).

Like in all eukaryotes, plant cells contain *endomembranes*, comprising the endoplasmic reticulum (ER), nuclear envelope, Golgi apparatus, endosomes, vacuolar network, the plasma membrane, *etc.* Organelles of the endomembrane system are dynamically connected either by vesicular shuttles or tubules. The bulk of these endomembranes is made of phospholipids, phosphatidylcholine (PC) being the most abundant (Fig. 1b), synthesized *de novo* in the ER. Protein sorting in the endomembrane system has been studied extensively, but little is known on the sorting of major phospholipid classes. Plant cells also contain mitochondria that resemble those of other eukaryotes, and membranes of which are also phospholipid-rich.

Plant cells are characterized by the presence of chloroplasts, membranes of which have a unique glycerolipid composition, containing up to 80% non-phosphated glycerolipids: the neutral monogalactosyl- and digalactosyldiacylglycerol (MGDG and DGDG), and the negatively charged sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG).^{1,2} Phospholipids are poorly represented, mainly as phosphatidylglycerol (PG). MGDG and DGDG are synthesized in the two membranes surrounding the chloroplast, called the envelope.

In this review we summarize our current understanding of the synthesis of chloroplast galactolipids within the complete glycerolipid metabolic scheme, viewed as a complex *system* at the whole cell scale. We highlight what we have learnt regarding the components and functioning of this system and some regulatory points, unravelled by: cell fractionation and biochemical analyses, genetic mutations (in particular of genes coding for the galactosyltransferases synthesizing MGDG and DGDG), transgene expressions (in particular of bacterial glycosyltransferases complementing loss of MGDG or DGDG), or environmental changes (in particular phosphate – Pi – shortage). We then introduce galvestine-1, a novel specific inhibitor of MGDG synthases, as a novel tool to analyze this system.

2. Overview of the membrane glycerolipid system in *Arabidopsis* photosynthetic cells

In plant cells, the glycerolipid metabolism relies on the cooperation of multiple organelles. The stroma of chloroplasts is the site of neosynthesis of all fatty acids (FAs). There are then two major sites of synthesis of membrane glycerolipids: the ER, producing mainly phospholipids, and the chloroplast envelope, producing mainly non-phosphated glycolipids. FAs esterified to glycerolipids vary in chain lengths (16 or 18 carbon atoms, C16 and C18 respectively) and unsaturation levels, from fully saturated species to acyls with 3 double bonds (*i.e.* from C16:0 to C16:3 and from C18:0 to C18:3). FAs bear therefore a signature that has been critical, in the pioneering work on plant lipid metabolism, to follow the biosynthetic and trafficking routes of glycerolipid intermediates. We reconstruct therefore the system shown in Fig. 2, starting with the synthesis of FAs.

2.1. The stroma is the cellular factory of fatty acids

The biosynthesis of C16- or C18-FAs thioesterified to ACP (16:0-ACP, C18:0-ACP) is achieved by two stromal enzyme systems, *i.e.* an acetyl-CoA carboxylase complex and a dissociable fatty acid synthase of type II (FASII) (Fig. 2, pathway a).

In the stroma, 18:0-ACP is desaturated into 18:1-ACP by the FAB2 delta-9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase (Fig. 2, pathway a). Export of fresh FAs to the cytosol precedes their esterification to CoA, thus feeding the cytosolic pool of acyl-CoAs.^{1,3–6}

2.2. The ER generates glycerolipids via the ‘eukaryotic’ pathway

Cytosolic acyl-CoAs and glycerol-3-phosphate (G3P) are precursors for the stepwise synthesis of lyso-phosphatidic acid (LPA) and phosphatidic acid (PA) in the ER (Fig. 2, pathway b). The specificity of the ER acyltransferases leads to the biosynthesis of PA with 16:0, 18:0 or 18:1 at *sn*-1 and 18:0 or 18:1 at *sn*-2 positions. PA can be dephosphorylated into diacylglycerol (DAG) (Fig. 2, pathway b). Both PA and DAG are at the origin of all phospholipids synthesized in the ER: PA is the precursor for phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI) or phosphatidylserine (PS) *via* the CDP-DAG pathway and DAG is the precursor for the phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC) *via* the Kennedy pathway. DAG can be alternatively acylated at position *sn*-3 producing triacylglycerols (TAGs), also known as oils. Membrane glycerolipids generated in the ER, with 18-carbon acyls at the *sn*-2 position, harbour a diacyl structure known as ‘eukaryotic’^{1,6–8} (Fig. 2, pathway b; eukaryotic lipids are framed in blue).

2.3. The plastid envelope assembles glycerolipids, using ‘prokaryotic’ substrates freshly synthesized in the envelope or imported ‘eukaryotic’ lipid precursors

Plastid membranes contain low proportions of phospholipids, mainly the negatively charged PG, some PC strictly localized in the outer leaflet of the outer envelope membrane (OEM) bilayer,⁹ PI, occurrence of which in the envelope has not been investigated in depth, and eventually PA.¹⁰ The lipid composition of each sub-compartment of the chloroplast is not uniform. The OEM is DGDG-rich, whereas MGDG is the main lipid of the inner envelope membrane (IEM). Lipid distribution in thylakoids is close to that of the IEM, reminiscent of the origin of the photosynthetic membranes budding from the IEM. Chloroplast glycerolipids are not only structural components making the bulk of membrane bilayers: MGDG, DGDG, SQDG and PG associate specifically with essential protein complexes including the photosystems¹¹ and the plastid protein import machinery.¹² Due to their importance for chloroplast biogenesis and for the photosynthetic machinery, it is not possible to genetically abolish the syntheses of MGDG,¹³ DGDG¹⁴ or plastid PG.¹⁵

The envelope is the site of assembly of these lipids:¹ PG is synthesized from PA, *via* a CDP-DAG pathway and MGDG, DGDG and SQDG are assembled from PA after its dephosphorylation into DAG. PA and DAG can be synthesized *de novo* in the plastid (Fig. 2, pathway c) by the action of acyltransferases (ATS1 and ATS2) and a plastid phosphatidic acid phosphatase (PAP) of the IEM.¹⁵ The specificity of ATS1 and ATS2 leads to the production of PA and DAG with 18:1 and 16:0 at positions *sn*-1 and *sn*-2 respectively. The glycerolipids thus assembled in the plastid, with C16 FAs at the *sn*-2 position,

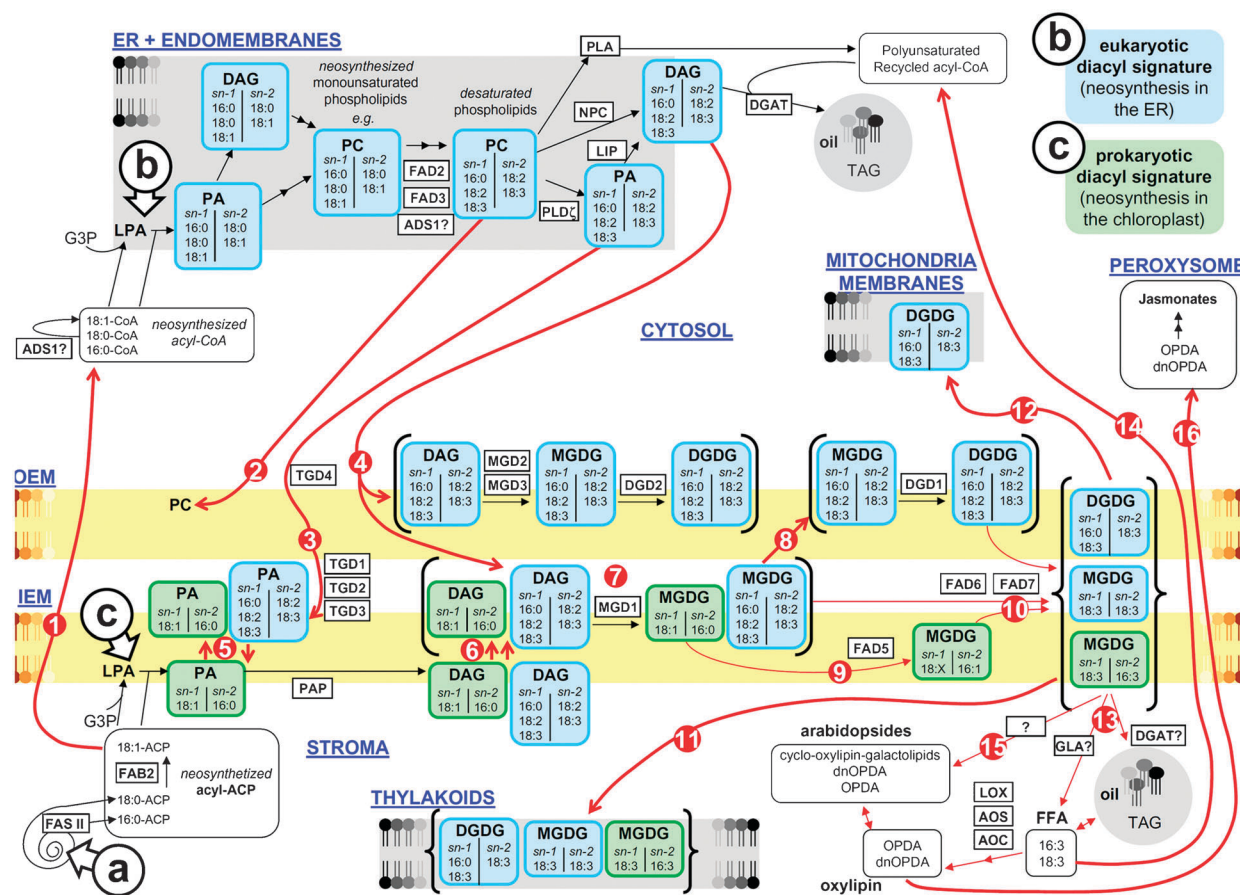


Fig. 2 The plant cell glycerolipid system. This scheme highlights sixteen yet unresolved questions regarding the biosynthesis or metabolism of plastid galactolipids and galactolipid-associated fatty acids. The plant cell glycerolipid system results of the combination of three main pathways (a), (b) and (c). (a) Fatty acid biosynthesis in the stroma. (b) Biosynthesis of 'eukaryotic' phosphatidic acid and diacylglycerol in the endoplasmic reticulum. (c) Biosynthesis of 'prokaryotic' phosphatidic acid and diacylglycerol in the chloroplast envelope. For each lipid, the acyl profile is indicated, with the number of carbons (16 or 18), the major unsaturation levels (16:0 to 16:3 and 18:0 to 18:3) and the esterification at the *sn*-1 and *sn*-2 positions of glycerol. Cellular fates of 'eukaryotic' and 'prokaryotic' glycerolipid intermediates are highlighted in blue and green respectively. In this scheme, most enzymes are known and localized, but sixteen major processes remain to be characterized: (1) export of freshly synthesized FAs from stroma to cytosol, (2) import of PC to the outer leaflet of the outer envelope membrane (OEM), (3) import of PA or other lipids by the TGD complex, (4) import of eukaryotic DAG, (5) and (6) translocations of PA and DAG in the inner envelope membrane (IEM), (7) precise topology of MGD1 facing the inner or outer side of the IEM, (8) transfer of MGDG to the OEM, (9) desaturation of 16:0 by FAD5, (10) localization of all desaturations, (11) transfer of lipids from the IEM to the thylakoids, (12) export of DGDG from the chloroplast envelope to the plasma membrane, tonoplast or mitochondria under Pi shortage, (13) release of 16:3 and 18:3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) from galactolipids for the synthesis of TAGs in the plastid, (14) export of polyunsaturated fatty acids to the cytosol, (15) biosynthesis of cyclo-oxylin-galactolipids and (16) export of oxylipin precursors. *Abbreviations for cell compartments:* ER, endoplasmic reticulum; OEM, outer envelope membrane; IEM, inner envelope membrane; STROMA, stroma; THYLAKOIDS, thylakoids. *Abbreviations for lipid metabolites:* ACP, acyl carrier protein; DAG, diacylglycerol; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; G3P, glycerol-3-phosphate; LPA, lyso-phosphatidic acid; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; OPDA, oxo-phyto-dienoic acyls; PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol; TAG, triacylglycerol. *Abbreviations for proteins:* ADS1, delta-9 acyl-lipid/CoA desaturase; AOC, allene oxide cyclase; AOS, allene oxide synthase; DGAT, diacylglycerol acyl-transferase; DGD1 and DGD2, DGDG synthases 1 and 2; FAB2, delta-9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase; FAD5, palmitoyl-MGDG Δ^7 -desaturase; FAD6, omega-6 fatty acid desaturase; FAD7, omega-3 fatty acid desaturase; FAS II, multienzymatic system of the fatty acid synthase of type II; GLA, galactolipase A; LIP, lipin phosphatidate phosphatase homologue; LOX, lipoxygenase; MGD1, MGD2 and MGD3, MGDG synthases 1, 2 and 3; NPC, non-specific phospholipase C; PAP, phosphatidate phosphatase; PLA, phospholipase A; PLD ζ , phospholipase D ζ ; TGD1, TGD2, and TGD3, components of the TGD phospholipid ABC transporter; TGD4, phosphatidic acid binding protein associated to the TGD transporter.

harbor a diacyl structure known as 'prokaryotic', similar to that observed in cyanobacteria glycerolipids^{1,6-8} (Fig. 2, pathway c; prokaryotic lipids are framed in green).

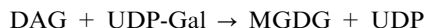
Import of eukaryotic precursors is reflected by the high proportion of eukaryotic signatures in galactolipids. Although this import has been known for long,¹⁶ only recent advances combining the analysis of the response of *Arabidopsis* to

environmental stresses, transcriptomic studies and characterization of genetic mutants, have pinpointed some proteins involved in this import (see below).

2.4. Critical position of galactolipid synthesis within the system

2.4.1. MGDG synthesis. Synthesis of galactolipids is initiated by the assembly of MGDG in the envelope membranes

surrounding plastids. In *Arabidopsis*, a multigenic family of three MGDG synthases (MGD1, MGD2, MGD3) has been identified,¹⁷ catalyzing the transfer of a galactosyl residue from uridine diphospho-galactose (UDP-Gal) to a DAG acceptor:



MGDG synthesis is a critical step in the complete membrane glycerolipid system. *Upstream*, DAG used for MGDG synthesis can be produced by both the 'prokaryotic' and 'eukaryotic' pathways described above. MGD enzymes are therefore at a key position to play a role in the coupling of extra-plastidial lipid metabolism with chloroplast lipid metabolism. *Downstream*, MGDG is a precursor for DGDG synthesis; it is a source of polyunsaturated FAs (PUFAs), stored as triacylglycerol, which can also be used by the plant as precursors for the synthesis of oxylipins like jasmonic acid. Eventually MGDG can also be directly conjugated to jasmonic acid intermediates and other oxidized FA species, forming a class of monogalactolipids called the 'arabidopsides' (Fig. 2) (see below).

Combining *in vitro* characterization of enzymatic activity, analyses of subcellular fractions of chloroplast membranes^{18–22} and GFP-fusion localization by epifluorescent microscopy,¹⁷ MGD1 was shown to be the most abundant and most active MGDG synthase, localized in the IEM of chloroplasts, and being essential for the massive expansion of thylakoids. It has been initially proposed that this enzyme should be oriented toward the inter-membrane space as shown in Fig. 2, consistently with the apparent lack of UDP-Gal in NMR spectra of chloroplast stroma.²² In a recent report, an epimerase catalysing the conversion of UDP-Glc into UDP-Gal inside rice chloroplasts was shown essential for the biosynthesis of galactolipids.²³ Since the *Arabidopsis* homologue (At2g39080) is embryo-defective when mutated, the metabolic route supplying UDP-Gal in the stroma for galactolipid syntheses should be re-examined. Genetic knockdown of *MGD1*, in the *Arabidopsis mgd1-1* mutant,²⁴ characterized by a ~75% decrease of *MGD1* mRNA and a ~40% decrease of *MGD1* protein content, led to a 50% decrease of the chlorophyll content, an impairment of the chloroplast structure with less thylakoids and a yellow-green phenotype of the leaves. Genetic KO of *MGD1*, in the *mgd1-2* mutant,²⁵ is lethal in the absence of an external source of the carbon substrate.¹³ In the *mgd1-2* background, the DGDG content decreases drastically, showing that MGD1 mainly supplies the substrate for the bulk of DGDG in chloroplasts. By contrast with MGD1 localized in the IEM and producing the huge amount of MGDG required for thylakoid expansion, MGD2 and MGD3 are localized in the OEM and operate under Pi shortage¹⁷ (Fig. 2). Genetic knockout of *MGD2* and *MGD3* and double *mgd2* × *mgd3* mutants have no striking phenotype under normal growth conditions.²⁶

Based on its critical position in the scheme, MGDG synthesis is therefore at the crossroad of metabolism (providing lipids for the bulk of photosynthetic membranes, but also upstream the production of TAGs as carbon storage) and signaling (providing PUFAs for the syntheses of oxylipins or being directly linked to oxylipins, forming arabidopsides). Due to their high proportion in photosynthetic membranes, MGDG and DGDG represent

the most profuse lipid class on Earth.²⁷ Since genetic KO of genes is either lethal for MGD1 or apparently dispensable for MGD2 and MGD3, MGDG synthases were therefore chosen as a target to develop novel specific inhibitors, described below, among which galvestine-1,²⁸ to make chemical genetic approaches possible.

2.4.2. DGDG synthesis. Part of MGDG, specifically with an eukaryotic structure, is a substrate for the synthesis of DGDG by DGDG synthases (DGD1 and DGD2 in *Arabidopsis*).⁷ In green tissues, the fatty acid composition of MGDG and DGDG is strikingly different. In particular, MGDG is 16:3-rich whereas DGDG is 16:0-rich. This indicates that FAD5, catalyzing the earliest step of 16:0 desaturation at the *sn*-2 position, initiates the very rapid 16:0 → 16:1 → 16:2 → 16:3 desaturation of MGDG, and diverts this substrate from its utilization by DGD1 and DGD2, for a possible transformation into DGDG.

Genetic KO of DGD1 in the *dgd1* mutant²⁹ led to a pronounced deficiency in DGDG with only ~10% of the wild type level. The *dgd1* mutant is strongly affected in growth and photosynthetic efficiency. By contrast the KO of DGD2 in the *dgd2-1* and *dgd2-2* mutants¹⁴ had apparently no defect in growth and photosynthesis. The *dgd1* × *dgd2* double mutant¹⁴ was far more affected than the *dgd1* single mutant. Still, in this double mutant, a minor proportion of digalactolipid could be detected, due to the presence of an alternative pathway speculated to result from the activity of a galactolipid:galactolipid galactosyltransferase (see below).

The analyses of all mutants, grown in various phosphate regimens, are coherent with a specific cooperation of some MGD and DGD proteins, possibly by physical contacts, for DAG → MGDG → DGDG channeling. DGD1 in the OEM seems to galactosylate MGDG produced in the IEM by MGD1, whereas DGD2 in the OEM seems to use substrates generated in the OEM by MGD2 and MGD3 under Pi shortage.^{7,30} These [MGD1–DGD1] and [MGD2/3–DGD2] associations are shown between brackets in Fig. 2.

2.4.3. Conversion of galactolipids into TAGs, oxylipins and arabidopsides. The acyls esterified to MGDG can be desaturated by FAD5, FAD6 and FAD7/8, forming PUFAs (16:2, 16:3, 18:2, 18:3), which can be released and stored in TAGs inside the plastid³¹ (Fig. 2). PUFAs can be also converted into oxygenated forms *via* a plastid lipoxygenase (LOX)/allene oxide synthase (AOS) pathway.³² 16:3 thus gives rise to dinor-oxo-phytodienoic acyls (dnOPDA) and 18:3 to oxo-phytodienoic acyls (OPDA). OPDA and dnOPDA exported to the peroxysome (Fig. 2) are precursors for oxylipins, including jasmonic acids (JAs). Interestingly MGDG can also be directly esterified to OPDA and dnOPDA,³² forming cyclo-oxylipin-galactolipids, called 'arabidopsides' that accumulate under certain conditions like pathogen attacks. It has been recently reported by different teams that an unsuspected large variety of oxylipin-bound galactolipids could be detected by sensitive mass spectrometry methods.^{33,34}

2.4.4. Conversion of galactolipids into DAG by SFR2. Under freezing conditions or exposure to ozone, transfers of galactose between galactolipids can also occur by the action of a galactolipid:galactolipid galactosyltransferase (GGGT), activity of which has been known for decades.^{8,35,36}

The *SENSITIVE TO FREEZING 2* (*SFR2*) gene was recently demonstrated to encode such enzyme.^{37,38} The galactosyl polar head of MGDG is transferred to another galactolipid, releasing DAG and DGDG, tri-GDG and tetra-GDG. DAG produced by GGGT would then be used as substrate for TAG production in the envelope, contributing physically to freezing tolerance of plastid membranes.

The characterization of the *SFR2* provided one of the very few missing genes coding for enzymes shown in Fig. 2. This comprehensive knowledge on enzymes hides the very poor comprehension of numerous processes shown in this figure (16 unknown or partially characterized processes are listed in Fig. 2). New strategies, taking advantage of global approaches, and new tools have therefore been developed.

2.5. Sixteen enigmas of plastid lipid exchanges with the cytosol and other organelles

The lipid dynamics in photosynthetic plant cells is therefore an important and complex section of carbon metabolism and implies numerous reactions and lipid movements in or *via* the plastid envelope. In *Arabidopsis*, >120 enzymatic reactions and >600 genes have been inventoried in acyl-lipid metabolism,⁵ and proteomics has highlighted the compartmentalization of most of the involved chloroplastic proteins.⁶ In Fig. 2, we highlighted in red 16 unknown or still enigmatic processes necessary to comprehend the complex lipid dialog between the plastid and the cytosol: (1) the export of freshly synthesized FAs; (2) the import of PC to the outer leaflet of the OEM and its role; (3) the precise mechanism and role of PA import by the TGD complex; (4) the un-characterized machinery importing eukaryotic DAG, to feed MGD1 in the IEM and MGD2 and MGD3 in the OEM; (5) and (6) the translocations of PA and DAG from one monolayer to another (or flip-flop) in the IEM; (7) the precise topology of MGD1 facing the inner or outer side of the IEM; (8) the transfer of MGDG produced in the IEM by MGD1 to the OEM, where it serves as substrate for DGD1; (9) the desaturation of 16:0 by FAD5 forming a desaturated MGDG, which is not used as substrate for DGDG synthesis; (10) the localization of all desaturation reactions; (11) the transfer of lipids from the IEM to the thylakoids; (12) the machinery(ies) that export(s) DGDG under low Pi conditions; (13) the processes that release PUFAs from galactolipids for the synthesis of TAGs in the plastid; (14) the export of PUFAs; (15) the unresolved biosynthesis of cyclo-oxylin-galactolipids and (16) the export of dnOPDA and OPDA.

In the following sections, we show how the combination of different approaches have allowed essential breakthroughs in our knowledge of the glycerolipid membrane system, combining biochemistry, genetics, transcriptomics, proteomics, and point the benefits we expect from chemical genetics.

3. Dissection of the membrane glycerolipid system using natural perturbations (phosphate shortage) combined with transcriptomic and genetic studies

3.1. Phosphate shortage triggers a breakdown of phospholipids, fueling galactolipid synthesis

The search for components of the membrane glycerolipid system, and particularly those operating in the diversion of

'eukaryotic' intermediates from the ER toward the production of MGDG has benefited from the analyses of the effect of phosphate (Pi) shortage, since this natural stress provokes a spectacular remodelling of cellular lipids. Using lipidomic analyses of *Arabidopsis* cells grown in media supplied with various Pi concentrations, it has thus been shown that Pi shortage triggered a transient accumulation of PC, its subsequent hydrolysis and a net conversion of the hydrolyzed PC into galactolipids *via* the eukaryotic pathway.³⁹ Study of the transcriptomic response of *Arabidopsis* whole plants to low Pi^{40,41} combined with genetics has highlighted genes coding for phospholipases D (PLD ζ 1, and 2) and phospholipases C (two PLCs known as NPC4 and 5), mutated phenotypes of which are consistent with a supply of precursors for MGDG^{1,3,7} (Fig. 2). On the one hand, PA produced by PLDs can be transferred across the plastid envelope by an ABC transporter named the TGD complex⁷ (Fig. 2). After reaching the IEM, imported PA can then be dephosphorylated by a PAP, thus generating DAG. The TGD2⁴² and TGD4⁴³ proteins associated to the TGD transporter have been shown to specifically bind PA. Transport of other phospholipids in the TGD complex is also possible.⁴⁴ On the other hand, DAG produced by phospholipases C (PLCs) or endomembrane phosphatidic acid phosphatases⁴⁵ might be directly transported to the plastid envelope by an unknown mechanism (Fig. 2).

3.2. DGDG export from the chloroplast and phospholipid-to-DGDG exchange in the plasma membrane, tonoplast and mitochondria

Although galactolipids are restricted to chloroplasts in plant cells grown under non-limiting conditions, Pi shortage was shown to induce a specific export of DGDG to extraplastidial compartments, including the plasma membrane, the tonoplast and the mitochondrial envelope,^{46–50} where it can substitute to phospholipids, particularly PC.^{1,7,51,52} Export of DGDG to mitochondria was confirmed by immunostaining with anti-DGDG antibodies⁵⁰ (Fig. 3), immuno-agglutination of mitochondria purified from *Arabidopsis* cells grown in low-Pi, and direct analysis of DGDG in these mitochondria fractions using NMR. To our current knowledge, none of the components involved in this spectacular DGDG relocation has been characterized. Since this export is not observed in *Arabidopsis* photosynthetic cells grown in rich medium (Fig. 3), one could hypothesize that this export depends on the overexpression of the DGD2 gene, the expression level of which is induced under Pi shortage,^{14,30} with a possible physical channelling *via* MGD2 or MGD3, DGD2 and an export machinery.

A very important series of studies^{53,54} supports an alternative hypothesis that DGDG export could be independent of the expression level of DGD1 or DGD2. The *dgd1*⁵³ and *dgd1dgd2*⁵⁴ mutants have been transformed to express a glucosyltransferase from *Chloroflexus aurantiacus*, customized to be addressed to the chloroplast. This enables the transfer of a glucose (Glc) residue to MGDG, thus generating glucosyl-galactosyldiacylglycerol (GlcGDG) instead of DGDG. The GlcGDG synthase transgene was under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter, and not under the control of DGD1 or DGD2 promoter. The ultrastructure of chloroplasts

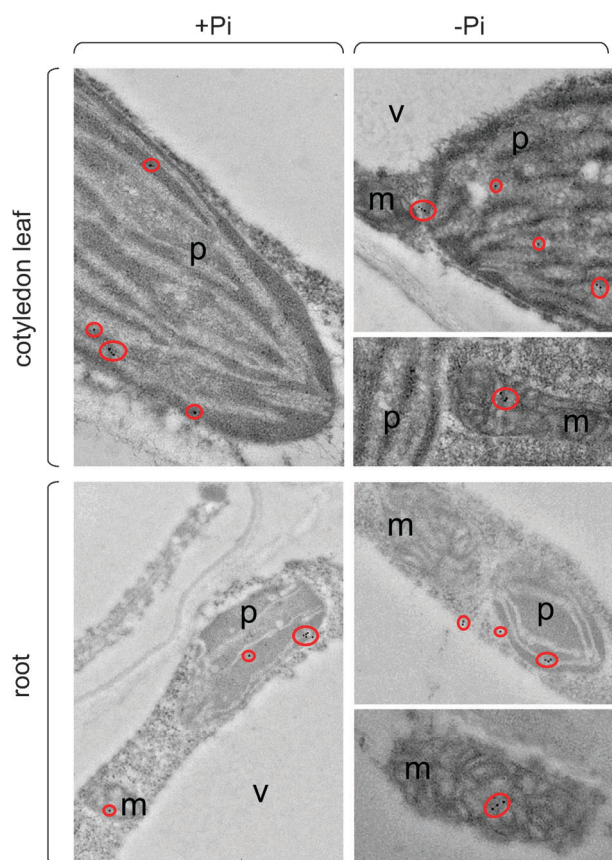


Fig. 3 Immunolocalization of DGDG in plastids and mitochondria in *Arabidopsis* cells. Immunogold labeling of DGDG in cotyledon and root cells of *Arabidopsis* grown for 4 days in the presence (+Pi) or absence (−Pi) of phosphate. In photosynthetic cotyledon cells and in Pi-rich medium, DGDG is strictly detected in chloroplast membranes (red circles), whereas upon Pi starvation, localization in mitochondria is also detected. In roots and in Pi-rich medium, DGDG is often detected in both plastids and mitochondria, indicating a constitutive transfer of DGDG to this organelle even in non-limiting Pi supply. In low Pi, detection in mitochondria seems to increase. Abbreviations: m, mitochondrion; p, plastid; v, vacuole.

was partially restored by the synthesis of GlcGDG but photosynthetic efficiency could not be fully complemented. Most strikingly, following Pi shortage, the quantity of GlcGDG in the transgenic *dgd1dgd2* background increased,⁵⁴ suggesting that the production of GlcGDG, and consequently of DGDG in the wild type, was not only attributable to an increase of the expression level of the gene coding for the GlcGDG synthases, and that it was possibly due to a ‘pushing’ force, *i.e.* an upstream increase of MGDG. In addition, GlcGDG was exported outside the chloroplast,⁵⁴ just like DGDG in wild type plants. This demonstrates that (1) the export machinery has a relatively broad specificity for DGDG and GlcGDG, and possibly other diglycosyldiacylglycerol, (2) the export machinery is operational under Pi shortage and (3) the export of DGDG or GlcGDG could act as a ‘pulling’ force for the increase of galactolipid synthesis. Following the law of mass action, pulling the [MGDG → DGDG] reaction by an export of DGDG would propagate to the [DAG → MGDG] reaction. Given an appropriate flux of the DAG substrate,

the amount of galactolipids might then increase even without an upregulation of MGD2, MGD3 or DGD2. This hypothesis needs to be validated, nevertheless, a change in the balance of galactolipid *vs.* phospholipids could combine short-term metabolic regulatory loops and long-term transcriptomic reprogramming.

3.3. Metabolic coupling of phospholipid breakdown and galactolipid synthesis by the activation of MGD1 by phosphatidic acid

A possible mechanism for a very rapid remodelling of glycerolipids following Pi shortage, prior to any change of the genetic expression of genes coding for galactolipid synthesizing enzymes, would be an activation of MGDG synthesis induced by phospholipid breakdown. Signal molecule candidates produced after the action of phospholipases are PA produced by PLDs and DAG produced by PLCs. PA is an attractive candidate for the following reasons. Firstly, the TGD transporter^{7,55} discussed above could allow its import in the IEM. Secondly, the role of PA as a substrate for the synthesis of galactolipids depends on its conversion into DAG by a chloroplast PAP, seems hampered in plants, in which this PAP is not active.⁵⁶ Thirdly, recombinant and native MGD1 from *Arabidopsis* is very strongly activated by very low proportions of PA.^{57,58}

Taking advantage of a three-dimensional model of MGD1 structure,⁵⁹ some amino acids possibly interacting with PA and other lipids have been pinpointed.⁵⁷ In depth structural studies together with functional analyses in membrane models reconstituted *in vitro* are now needed to characterize the molecular mechanism, by which PA can tune MGD1 activity.

4. Dissection of the membrane glycerolipid system using galvestine-1

4.1. Discovery of galvestine-1 and *in vitro* inhibition of MGD1, MGD2 and MGD3

Numerous inhibitors of MGDG synthases have been described (Table 1), but none is active or selective enough to be used for a chemical genetic strategy. They consist either of non-specific competitors of one of the substrates, *i.e.* UDP competing with UDP-Gal, or compounds reacting with amino acids exposed at the periphery of the protein. Chemical impairment of galactolipid synthesis is now made possible using molecules recently published,²⁸ following a 10-year drug-development program. Firstly, a miniature and robust assay has been developed to allow a robotic high throughput screening.⁶⁰ Inhibitors of *Arabidopsis* MGD1 were then obtained from a screen of 23 360 compounds and the active structure was optimized based on the synthesis and analysis of 250 analogues. The molecule with optimal activity both *in vitro* and *in vivo* was called galvestine-1²⁸ (Table 1 and Fig. 4a).

Galvestine-1 competes with DAG binding on MGD1.²⁸ The K_i relative to DAG is 11 times lower than the K_m measured for the DAG substrate. Conformational models of dioleoylglycerol and galvestine-1 have been generated by Molecular Dynamic simulations. The 3-dimensional comparison of models shows a superposition of structural portions of both molecules, including H-bond acceptors (white arrows), at the levels of the glycerol backbone of dioleoylglycerol and of the

Table 1 Literature survey of the inhibitors of MGDG synthases

Compound	<i>In vitro</i> inhibition of MGDG synthase activity	Mode of action	Specificity	Ref.
UDP, pH 7.8	K_i relative to UDP-Gal = 23 μ M ($K_{m,UDP-Gal} = 100 \mu$ M)	Competition with UDP-Gal, in the hydrophilic phase. ($K_i = 0.23 \times K_{m,UDP-Gal}$).	No	21, 61, 62
Free metal cations: Zn^{2+} and Cu^{2+} , pH 7.8	IC ₅₀ = ~ 0.1 mM (Zn^{2+}); ~ 0.5 mM (Cu^{2+})	No inhibition at pH 6, indicating that the bivalent cations bind to histidyl residues at the periphery of the protein. Reversible in the presence of hydrophilic chelating agents like EDTA, 2 mM.	No	18, 36
Citraconic anhydride, pH 7.8	IC ₅₀ = $\sim 10 \mu$ M	Covalent reaction with primary amines, either at the levels of e-lysyl residues at the periphery of the protein or at the N-terminus of MGD enzymes. Reversible at alkaline pH.	No	21
<i>N</i> -Ethylmaleimide	IC ₅₀ < 8 μ M	Covalent reaction with sulfhydryl groups in cysteyle residues at the periphery of the protein. Ineffective in the presence of reducing agents like dithiothreitol, 1 mM.	No	63
<i>ortho</i> -Phenanthroline	IC ₅₀ = ~ 0.1 mM	Hydrophobic planar chelating agent, believed to act at the level of metal atoms required for the activity of MGDG synthases. Effect reverted partially by a series of bivalent cations.	No	21
<i>S</i> -Nitroso- <i>N</i> -acetylpenicillamine Galvestine-1	IC ₅₀ = ~ 1.3 mM K_i relative to DAG = 0.235 mole fraction ($K_{m,DAG} = 2.59$ mole fraction); IC ₅₀ in the μ M range.	Nitric oxide donor, believed to act either by oxidation of a metal coordinated to the protein or by sulfhydryl group nitrosylation. Competition with DAG, in the hydrophobic phase ($K_i = 11 \times K_{m,DAG}$).	No	This article 28
			MGD1, MGD2, MGD3	

(1,2-dihydro-2-oxobenzof[*d*]imidazol-3-yl)piperidine-1-carboxylate scaffold of galvestine-1 (Fig. 4b). To our knowledge, galvestine-1 is thus one of the very few competitive inhibitors of DAG, besides phorbol esters, having a clearly distinct scaffold compared to the acyl-glycerol structure.

Galvestine-1 inhibits the complete MGD1, MGD2 and MGD3 multigenic family and is thus a molecular tool enabling the impairment of all MGDG synthases, which could not be attained by genetic knockout.

4.2. *In vivo* inhibition of MGDG synthesis in *Arabidopsis thaliana* treated with galvestine-1

The addition of increasing amounts of galvestine-1 to the growing medium of *Arabidopsis* led to a dose-dependent control of MGDG level *in planta*,²⁸ with a severe chlorosis at highest doses. At low doses, chlorosis was more pronounced around vascular tissues, consistent with a root uptake and a circulation in the xylem and mesophyll. *In vivo* inhibition of MGDG synthesis was measured by metabolic labeling experiments with [¹⁴C]-acetate, showing a reduction of MGDG content, compared to other lipids, and an impairment of chloroplast development.

4.3. Genetics vs. chemical genetics: comparison of *mgd* mutants with galvestine-1 treated plants

In wild type *Arabidopsis*, MGDG acyl-profile is mostly made of 16:3 and 18:3, indicating that the neosynthesized MGDG (C18:1/C16:0) is very rapidly desaturated by FAD5 and then by FAD6 and FAD7/8, producing polyunsaturated MGDG (C18:3/C16:3). By contrast, DGDG mostly contains 16:0 and 18:3 fatty acids, with C16:0 at position *sn*-1 (C16:0/C18:3), indicating that a bifurcation in the utilization of MGDG occurs between DGD1/DGD2 and FAD5.

In the knocked down *mgd1-1* mutant,²⁴ the MGDG content decreases, whereas that of DGDG remains stable. This result indicates that, although its quantity has decreased, MGDG is not limiting for the production of DGDG. A channeling of

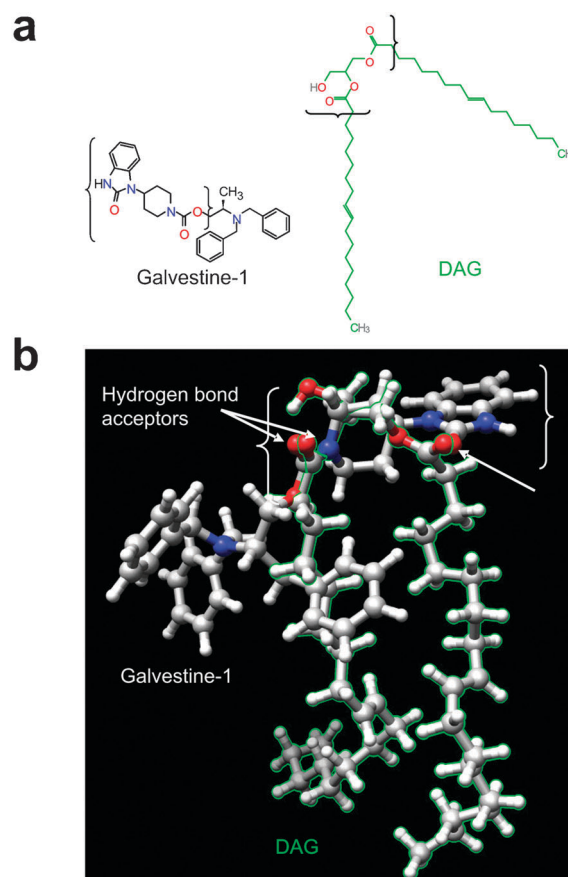


Fig. 4 Comparison of galvestine-1 and the diacylglycerol substrate of MGD1. (a) Galvestine-1 and dioleoylglycerol. Galvestine-1 is shown with the (1,2-dihydro-2-oxobenzof[*d*]imidazol-3-yl)piperidine-1-carboxylate scaffold between brackets, critical for interaction with MGD1, as long as a hydrophobic section is present. The formula of a dioleoylglycerol (DAG) shows the glycerol region between brackets, where the reaction catalyzed by MGD1 occurs. (b) Superimposition of the three-dimensional structures of dioleoylglycerol and galvestine-1. DAG is highlighted in green.

the freshly produced C16:0-rich MGDG toward the production of DGDG, *via* MGD2 or MGD3, might thus occur.

In the knocked out *mgd1-2* mutant,²⁵ plantlets grow only on sugar-rich medium, and they are albino. A minute amount of MGDG and DGDG is detected, showing that in this severe genetic background, the remaining MGD2 and MGD3 enzymes are not sufficient to allow a sustained production of DGDG. The acyl profile of MGDG is enriched in C16:0, C18:0, C18:1 and C18:2, indicating that this lipid has been produced using 'eukaryotic' precursors imported from the cytosol (Fig. 2). Very interestingly, the DGDG acyl profile is identical to that of MGDG supporting, again, a channeling *via* MGD2 or MGD3 and the DGD1 or DGD2 enzymes. The lack of any C16:3 MGDG indicates that a channeling *via* MGD1 and FAD5 is very likely to occur in the wild type background.

The *mgd2*, *mgd3* and *mgd2* × *mgd3* mutants²⁶ had no striking phenotype under normal growth conditions, indicating a very important point, which is that MGD1 could synthesize the MGDG required for the membrane expansion of both the IEM and the OEM. There is therefore no correlation between the localization of MGD1 and the expansion of the IEM or the localization of MGD2/MGD3 in the OEM with the biogenesis of this membrane. Both OEM and IEM could thus be generated using MGDG synthesized by a single MGDG synthase, localized in one of these two membranes. A change in the lipid profile could be assessed for *mgd3-1* upon phosphate starvation, showing a role for this gene in response to phosphate variations. Besides this condition, MGD1 apparently complemented the loss of MGD2 and MGD3. A puzzling possible function for MGD2 and MGD3 was highlighted by the specific expression pattern during the elongation of the pollen tube,⁶⁴ whereas the expression of MGD1 in this cell type remains very low. This correlates with an increase of the synthesis of MGDG and DGDG in the growing pollen tube,⁶⁵ but the *mgd2* × *mgd3* double mutant²⁶ was not male sterile. Given the impossibility to study a triple mutant, no conclusive role for MGDG synthesis in the pollen tube could be deduced (see below).

The treatment of *Arabidopsis* with galvestine-1 allowed therefore the analysis of a condition that could not be tested by genetic approaches, *i.e.* a targeting of all members of the MGD gene family in the same background. At increasing doses of galvestine-1, all MGD1, MGD2 and MGD3 proteins are targeted.²⁸ The acyl profile of MGDG is enriched in C16:0, C18:0, C18:1 and C18:2 in a dose-dependent manner and this evolution is mirrored in the PC acyl profile. Thus, the targeting of all MGDG synthases highlights the stimulation of the 'eukaryotic' route to produce galactolipids, to the expense of the 'prokaryotic' one and a dose-dependent impairment of the MGDG desaturation initiated by FAD5. The phenotype of treated plants was mostly consistent with an impairment of MGD1. Very interestingly, the role of MGDG in specific cell types, such as pollen tube, could eventually be explored in more detail.

4.4. Relation between MGD1, MGD2 and MGD3 expression pattern and *Arabidopsis* development

4.4.1. Leaves and photosynthetic tissues. As extensively detailed in this review, the roles of galactolipids in the biogenesis

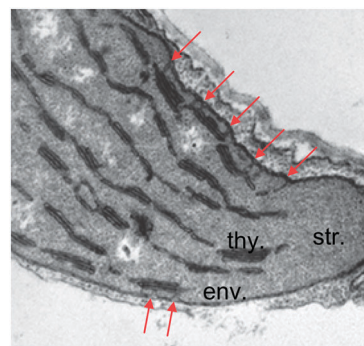


Fig. 5 Membrane connections between the inner envelope membrane and the thylakoids in leaf chloroplasts of *Arabidopsis* treated with galvestine-1. Electron micrograph showing connections between the IEM and the thylakoids, in chloroplasts of the mesophyll of *Arabidopsis* grown in the presence of galvestine-1. Membrane connections are shown by red arrows. Abbreviations: env., envelope; str., stroma; thy., thylakoids.

of the chloroplast envelope and photosynthetic membranes, in the appropriate functioning of the photosystems, and in the intense lipid remodelling occurring at the whole cell level upon Pi shortage, have been dissected by combining various approaches.

Both the genetic KO of *MGD1*²⁵ and chemical inhibition of MGDG synthases²⁸ have similar effects on the chloroplast ultrastructure, leading to a chlorosis, and on the photosynthetic efficiency. Fig. 5 shows that connections or membrane bridges between the IEM and the thylakoids appear when MGD1 activity is blocked.^{25,28} It is not known if these IEM–thylakoid structures correspond to the interruption of the biogenesis of thylakoids, or if they correspond to blocked bridges having a specific function in the biology of the chloroplast.

The transcriptomic response of *Arabidopsis* to increasing doses of galvestine-1²⁸ shows that the appearance of these IEM–thylakoid connections or membrane bridges is independent of the expression level of *VIPP1* (*VESICLE-INDUCING PROTEIN IN PLASTIDS*), thought to be involved in the biogenesis of photosynthetic membrane by IEM budding and vesicle transfer.⁶⁶ A possible non-vesicular mechanism for the biogenesis of thylakoids is thus highlighted, implying a coupling with the synthesis of galactolipids.

The expression pattern of the multigenic family of enzymes suggests a correlation with *Arabidopsis* development, with *MGD1* expressed in green tissues and *MGD2* and *MGD3* in non-green organs. Using galvestine-1 to block all MGDG synthases, the anatomy of leaves seems unaffected, including well developed trichomes,²⁸ indicating that no developmental change was triggered in leaves. The impact of genetic or chemical impairment of MGDG synthases on *Arabidopsis* development is more visible in non-green organs.

4.4.2. Root development and lipid remodeling following environmental changes. The expression pattern of *MGD1*, *MGD2*, *MGD3*, *DGD1* and *DGD2* indicates that, in roots, MGDG synthesis relies mainly on *MGD3*¹⁷ and DGDG synthesis mainly on *DGD2*. Plants treated with galvestine-1 have a striking phenotype at the root level, with a thickening of the root apex, a large cap, and less root hair. The development of lateral roots is also impaired.²⁸ Root cells contain non-green plastids,

accumulating starch, and having far less membranes, and consequently less galactolipids, than chloroplasts. In *Arabidopsis* roots, MGDG is 16:0-rich, and contains higher proportions of 18:0, 18:1 and 18:2 acyls than MGDG isolated from leaves; in addition, DGDG acyl profile is very similar to that of MGDG.⁶⁷ This galactolipid composition is therefore very different to that in leaves discussed above, and is consistent with a synthesis of MGDG and DGDG using 'eukaryotic' precursors (see Fig. 2), imported after the hydrolysis of phospholipids from the endomembranes, a route which is usually stimulated by phosphate shortage. A DAG → MGDG → DGDG channeling is likely to result from the cooperation of MGD3 and DGD2. As stated above, *MGD3* expression is stimulated after Pi starvation. Interestingly, the presence of DGDG in some mitochondria of root cells could be detected, even when *Arabidopsis* grows with a supply of Pi (Fig. 3). The presence of DGDG in the plasma membrane from roots has been considered a contaminant for decades, however a recent analysis in oat shows clearly that in well-fertilized roots, the plasma membrane contains 3% DGDG.⁶⁸ The function of plastids as a supplier of DGDG for other cell compartments might thus be more important in roots. Upon Pi starvation, the transfer of DGDG to mitochondria (Fig. 3), tonoplast⁴⁸ and plasma membrane^{48,51,68,69} increases. In the plasma membrane, DGDG accumulates in the cytosolic leaflet,⁶⁸ and can spectacularly replace up to 70% of the phospholipids.^{48,49} It is therefore possible that roots have a constitutively active machinery for the export of DGDG, function of which is triggered by Pi shortage with a very high sensitivity to minor Pi variations. Galactolipid synthesis in the plastid is thus essential for the development of roots, consistently with the very severe phenotype observed upon treatment with galvestine-1.²⁸

4.4.3. Flower development and pollen elongation. The expression pattern of *MGD1*, *MGD2* and *MGD3* has attracted the attention on flowers, since *MGD2* and *MGD3* are the main genes expressed in these organs.¹⁷ In *Petunia* flowers, DGDG is the major galactolipid by contrast with other organs.⁷⁰ MGDG synthesis increases during flower development, and the MGDG acyl-profile is enriched in 16:0, 18:0, 18:1 and 18:2, consistently with a synthesis using 'eukaryotic' precursors (see Fig. 2). The highest level of galactolipids was measured in the pistil.⁷⁰ Using promoter::GUS fusions, a high expression level of *MGD2* and *MGD3* could be detected in growing pollen tubes,⁶⁴ consistently with an increase of galactolipid synthesis in these cells,⁶⁵ but without any striking difference in pollen tube growth in the *mgd2* × *mgd3* mutant,²⁶ supporting a complementation by *MGD1*.⁷¹ The *in vitro* growth of *Arabidopsis* pollen tubes was partly inhibited by galvestine-1 in a dose-dependent manner,²⁸ showing that half of the growth could be attributed to galactolipids. Accumulation of DGDG in the plasma membrane of pollen tube could be immunodetected²⁸ and suggests that in the pollen tube, plastids contribute to the very high demand for lipids requested by the plasma membrane expansion in one of the fastest cellular elongating systems.

The apparent lack of phenotype in the *mgd2* × *mgd3* mutant²⁶ supports that *MGD1* could be sufficient for an appropriate development of *Arabidopsis*. *MGD1* being mostly expressed in green tissues, one would expect that this gene has little effect on the development in non-green organs,

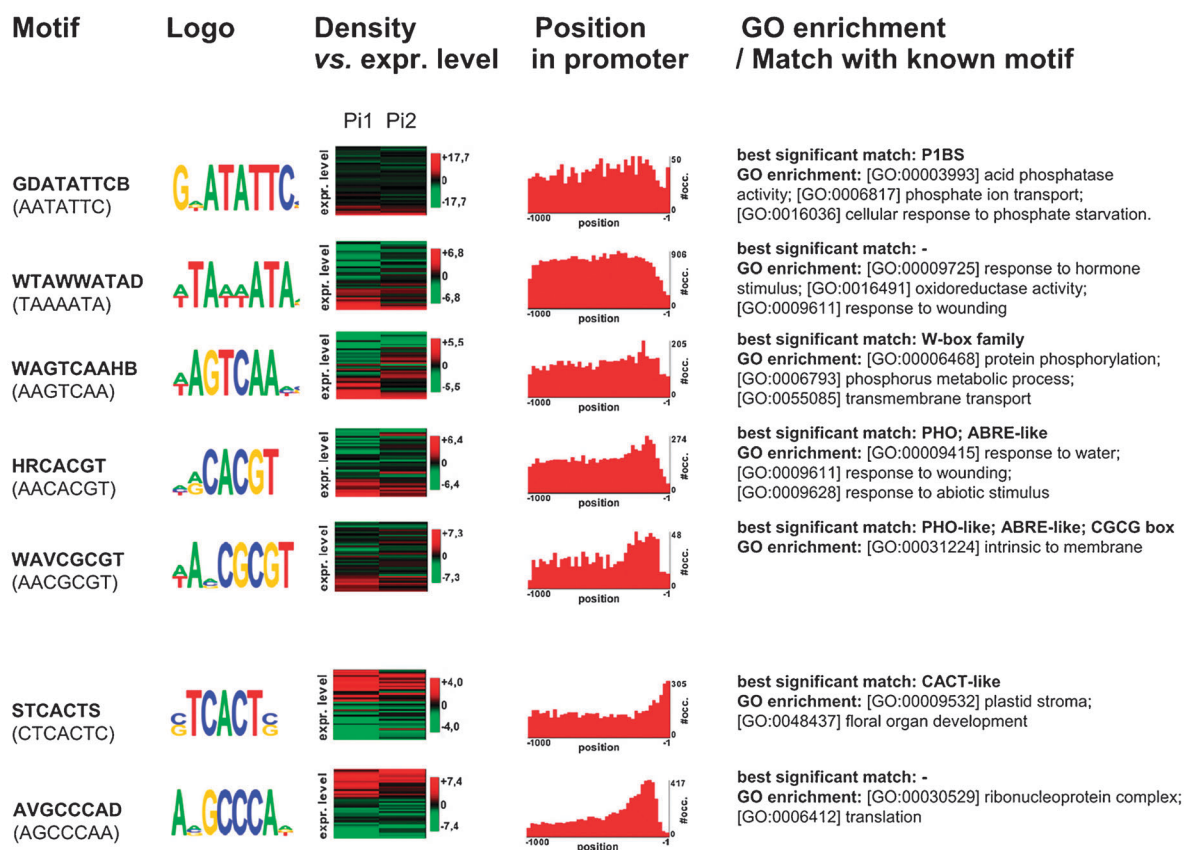
besides complementing a failure of *MGD2* or *MGD3*. Nevertheless, in a recent work, the *mgd1-2* severe mutation has been complemented with a very active bacterial MGDG synthase, cloned from *Chlorobaculum tepidum*,⁷² expressed under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. The complemented *mgd1-2* × *ChlorobaculumMGD* plants showed a nearly normal level of MGDG, but the chlorophyll content was reduced and the development program was strongly altered. Developmental defects included the loss of apical dominance in shoot growth, abnormal flower development and infertility. This study indicates that a connection exists between the expression pattern of *MGD1* and the development of the plant, including the architecture of the flower. The role of polar lipids in the regulation of flowering has been demonstrated for *N*-acyl-phosphatidylethanolamine (NAPE), hydrolysis of which releases bioactive lipids known as *N*-acylethanolamines (NAEs). Low levels of NAEs are correlated with an accelerated growth phenotype, increased sensitivity to abscisic acid or early flowering, whereas higher levels of NAEs delay the onset of flowering.^{73,74} To date, no data are available to comprehend why a change in the expression pattern of *MGD1* gene or a deregulation of *MGD1* enzyme might be deleterious to the development of non-green organs.

5. Search for unknown components and regulatory factors of the membrane glycerolipid system, combining genetics and chemical genetics

5.1. Mining the transcriptome of *Arabidopsis* in various environmental contexts, genetic backgrounds, chemical treatments

Perturbations of the membrane glycerolipid system may be achieved by natural treatments, like variations of the Pi level in soil, trigger transcriptomic responses, mining of which can be highly informative to identify unknown components. Taking the example of Pi starvation,^{40,41} *MGD2*, *MGD3* and *DGD2* were shown to be overexpressed. Plastid sulfolipid synthesizing gene, *SQD2*, is also among the first to be overexpressed. These genes explain the long term increase of galactolipid and sulfolipid induced by the lack of Pi. Genes coding for phospholipases, *i.e.* *PLDζ1*, *PLDζ2*, *NPC4* and *NPC5*, were also overexpressed and the study of the corresponding mutated phenotypes was consistent with a supply of precursors for MGDG.^{1,3,7}

Galvestine-1 is another tool to disturb the membrane glycerolipid system.²⁸ The effect on the expression levels of *MGD1*, *MGD2*, *DGD1*, *DGD2* was not in the two-fold range, but a slight decrease of *MGD1* and *MGD2* could nevertheless be observed after long-treatments with galvestine-1. The expression of 525 genes was downregulated in a dose- and time-dependent manner, including genes coding for thylakoid/chloroplast proteins, consistently with the strong effect of galvestine-1 on chloroplast biogenesis. These downregulated genes include *LOX2*, and *AOS* coding for enzymes converting PUFAs hydrolyzed from galactolipids into oxylipin precursors (see Fig. 2). A relation between the level of 16:3- and 18:3-rich MGDG and the activation of systemic acquired resistance (SAR), a mechanism induced by a broad spectrum of pathogens, have been recently shown in the *Arabidopsis sfd1* mutant.⁷⁵ The suppressor of fatty



b. Motifs correlating with galvestine-1 treatment

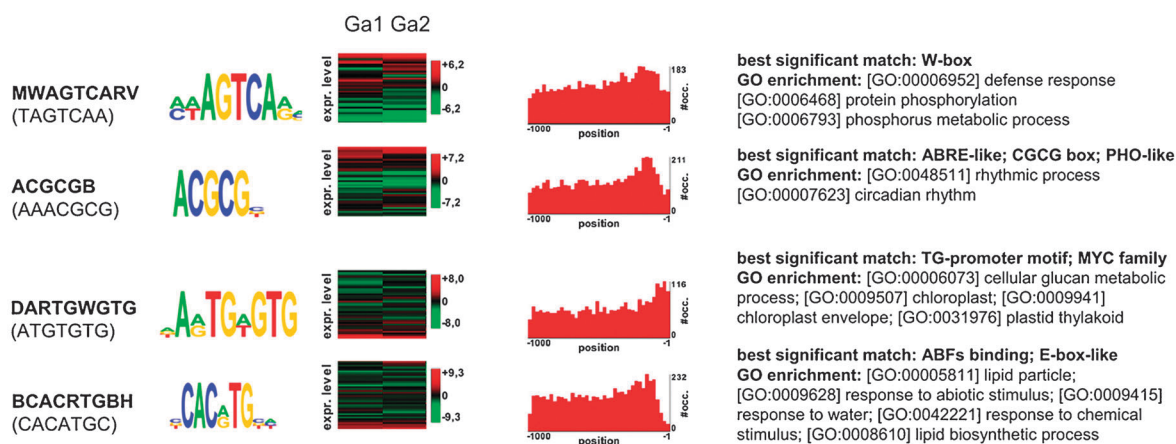


Fig. 6 DNA motifs in *Arabidopsis* gene promoters correlating with expression changes induced by phosphate starvation or galvestine-1 addition. Motifs and corresponding logo representations are shown on the left. Density of motifs in promoters of genes ranked by their expression level changes is shown with a color code from the lowest (green) to the highest (red) density. Distribution of the motif position in the -1000 promoter region is shown on the right. Significant matches with known *cis*-elements (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/> and literature) and GO enrichment in positive genes are indicated. (a) Motifs in promoters of genes up- and downregulated by Pi starvation. Data were obtained from transcriptomic profiles of *Arabidopsis* grown under full nutrition (FN), in low Pi ($-Pi$), and low Pi followed by a 3 hour Pi resupply (Resupply), from Morcuende *et al.* (2007).⁴¹ In Pi1 and Pi2 columns, genes are ranked following their expression level changes in (FN vs. $-Pi$) and (Resupply vs. $-Pi$) log ratios. The RED2 method (www.atgc-montpellier.fr/RED2) was used to estimate motif densities around each gene. Motifs in genes induced by low Pi have a higher density in the lower part of the two columns. *Vice versa*, motifs in genes repressed by low-Pi have a higher density in the upper part of the column. This clustering-independent method allows the recovery of known *cis*-elements induced by Pi starvation, *i.e.* P1BS, PHO, PHO-like and W-box. (b) Motifs in the promoter of genes up- and downregulated by galvestine-1 treatment. Data were obtained from transcriptomic profiles of *Arabidopsis* grown during 3 (D3) or 13 days (D13) in the presence of 100 μ M galvestine-1 and their respective controls with DMSO (C3 and C13 respectively), from Botté *et al.* (2011).²⁸ In Ga1 and Ga2 columns, genes are ranked following their expression level changes in (D3 vs. C3) and (D13 vs. C13) log ratios. Motifs in genes induced by galvestine-1 have a higher density in the upper part of the two columns. *Vice versa*, motifs in genes repressed by galvestine-1 have a higher density in the lower part of the column.

acid desaturase deficiency 1 gene (*SFD1* or *GLY1*) encodes a plastid dihydroxyacetone phosphate reductase/glycerol-3-P dehydrogenase, required for the accumulation of 16:3- and 18:3-rich MGDG and it is therefore involved in a lipid-based signaling process in SAR. Based on all these data, it is now essential to dissect the possible relations linking the levels of chloroplast galactolipids enriched in PUFAs, the production of oxylipins and/or arabidopsides, and some of the defense mechanisms induced by pathogen attacks.

In the list of galvestine-1 downregulated genes, 22 were reported to be upregulated following Pi starvation, including *SQD2* (see above), *PHO1;H1* and *PHO81* coding for Pi transporters and *SRG3* encoding a glycerophosphoryldiester phosphodiesterase. Among the 182 genes upregulated in a dose- and time-dependent manner, 69 were mostly overexpressed after a short exposure, 90 had an expression increasing with duration and concentration and 23 were strongly overexpressed under all conditions. Numerous lipid manipulating enzymes and putative lipid transporters are in these short lists of upregulated genes.²⁸

The lipid remodeling following the exposure to natural variations or chemical treatments is thus dependent on a genetic reprogramming, which is largely unknown. Part of the reprogramming following Pi shortage relies on Pi-specific local and systemic transcriptomic responses.⁷⁶ The orchestration of the expression of genes coding for lipid synthesizing enzymes, lipid converting enzymes and lipid transporters suggests that they are, at least partly, controlled by common transcription factors, binding to same classes of elements/boxes in their promoter regions. Genes systematically controlled by low Pi include *SQD1*, *SQD2*, *MGD2*, *MGD3*, *DGD2*, *PLD ζ 2*, *NPC4* and *NPC5*.⁷⁶ Among the *cis*-regulatory sequences known to be involved in low-Pi response (PIBS, PHO, PHO-like, W-box and Pi-responsive), only the PBS1 box (GNATATNC; PHR1-binding sequence) was shown to be present, with a high level of correlation, in the promoters of some, but not all, of the systematically controlled genes.⁷⁶

No *cis*-element responding to galvestine-1 is known; nevertheless, based on the transcriptomic response of *Arabidopsis* to galvestine-1,²⁸ bioinformatic methods can be used to detect DNA motifs in gene upstream regions (as an estimate of promoter regions) that correlate with the changes in expression level following treatments. Fig. 6 shows the analysis of the DNA motifs correlating with transcriptomic responses to Pi starvation and galvestine-1. Using the RED2 method (<http://www.atgc-montpellier.fr/RED2>), the PIBS, PHO, PHO-like and W-box *cis*-elements could thus be recovered from the transcriptomic data obtained after the growth of *Arabidopsis* in a full nutrition regimen, in Pi-starved medium, and in Pi-starved medium followed by resupply of Pi.⁴¹ With the transcriptomic data obtained when *Arabidopsis* grows in the presence of galvestine-1, two motifs matching with a W-box-like motif and an abscissic acid responsive element (ABRE)-like binding site⁷⁷ correlate with gene upregulation (Fig. 6). The presence of a W-box in the promoters of some genes induced by both low-Pi and galvestine-1 suggests the existence of a general response in both treatments. The ABRE motifs are also known to be involved in the repression of photosynthetic genes⁷⁸ and might explain the overall decrease

of genes coding for thylakoid/chloroplast proteins. This ABRE-like binding site was found in the promoter region of some lipid-related genes that were upregulated by galvestine-1, and suggests that part of the response might imply abscissic acid, or a crosstalk with abscissic acid/dehydration responses.⁷⁷ It has been shown in cowpea (*Vigna unguiculata*) that during water stress, an increase in DGDG leaf content is observed, with a stimulation of DGDG biosynthesis, measured by ¹⁴C-acetate labeling, and mRNA accumulation corresponding to *MDG1*, *MGD2*, *DGD1* and *DGD2*.⁷⁹ Blocking MGDG synthesis might thus trigger part of the water-stress program.

The ABRE-like motif in the promoter of genes upregulated by galvestine-1 shares some similarity with PHO in the promoter of genes upregulated by low-Pi (Fig. 6). The search for DNA motifs and combinations of motifs should therefore be refined, taking into account transcriptomic profiles obtained under more conditions and known to trigger long term membrane glycerolipid remodeling at the whole cell scale.

5.2. Screening *Arabidopsis* mutants

The candidate genes and gene families pointed by different methods should now be validated for their potential role in the membrane glycerolipid system shown in Fig. 2. This validation requires the study of corresponding *Arabidopsis* mutants, with in depth lipidomic profile analyses under various conditions including exposure to variable Pi concentrations and to galvestine-1. In addition, screening for galvestine-1 suppressors has been engaged.

5.3. Inputs of structural biology, organellar proteomics, *in vitro* reconstitutions and enzymology

As discussed in this review, transcriptome mining has been beneficial to build working models and comprehend long-term remodelling of lipid in plant cells following Pi shortage, but it has shown its limits in explaining the establishment of the membrane glycerolipid homeostasis in very short term responses.^{3,39,57} Metabolic regulatory loops, likely to involve PA as a central signaling lipid, allow the plant cell to couple phospholipid and galactolipid metabolic pathways in distinct compartments.⁵⁸ Lipid and protein relocations and enzymatic regulation by lipids are underestimated mechanisms, and their biochemical dissection by structural biology, organellar proteomics and *in vitro* and *in situ* studies are required. The modeling of three-dimensional structures of MGDG synthases^{57,59} and DGDG synthases⁸⁰ has been initiated based on homologies with crystallized glycosyltransferases, however, obtained models are still imperfect. *In vitro* reconstitutions using Langmuir and Langmuir Blodgett methods allow the association of enzymes with biomimetic lipid membranes⁸¹ and their use will therefore be critical in future studies for functional analyses of the system.

6. Conclusion and outlook

Our knowledge of the membrane glycerolipid system seems well documented regarding lipid manipulating enzymes, but it is weak at the level of protein subcellular localization, especially when proteins are soluble and recruited to different target membranes in various physiological contexts, and for proteins targeted to multiple compartments. Besides the ER-to-plastid TGD complex, lipid transporters are currently missing, especially for the export of

lipids from the plastid to other compartments. The control and regulation mechanisms of the membrane glycerolipid status at the whole cell scale combine metabolic regulatory loops, transcriptomic regulation, protein modifications and relocation, and we are still far from the complete picture. Future challenges include the unravelling of these different levels of regulations and crosstalks. Dissection of some molecular mechanism coupling phospholipid and galactolipid metabolism should be performed from the single protein, to the reconstituted biomimetic membrane and integrated at the cellular level. The relation between lipid metabolism and plant development, including flower development program, should be addressed. Eventually, the role of 16:3- and 18:3-rich galactolipids in lipid-based signaling processes should be characterized. Galvestine-1 appears as a useful tool to address all these points. This compound allows the chemical tuning of MGDG synthesis in specific cell types (like pollen tube) or organs for functional studies. It shall also be an essential tool to dissect the molecular mechanism of MGDG synthesis at the structural and enzymatic levels and in *in vitro* biomimetic systems. Galvestine-1 has allowed the identification of candidate genes, expression of which was significantly changed in *Arabidopsis* transcriptome in response to increasing doses, and the possible function of these genes in the membrane lipid system has now to be validated by genetic studies. This compound shall also be a tool to identify candidate genes in suppressor screening strategies.

Acknowledgements

Authors are supported by grants from Agence Nationale de la Recherche, *i.e.* ANR Emergence (E.M., M.A.B.), ANR ReGal (C.B., A.G.E., O.B., J.J., D.F., M.A.B., E.M.), ANR PlasmExpress (M.L., L.B., E.M.) and ANR CryoCor (B.S.J., J.M.). Fig. 3 has benefited from the facilities and expertise of the Imagif Cell Biology Unit of the Gif-sur-Yvette campus, France (www.imagif.cnrs.fr). All authors have contributed to the writing of the manuscript. L.B., C.Y.B., N.S., Y.Y.Y., C.B., A.G.E., J.J., D.F., M.A.B. have specifically addressed biochemical, metabolic, genetic and chemical genetic issues and contributed to the design of Fig. 1 and 2. J.M., B.S.J., D.F. and J.J. have specifically analyzed electron microscopy experiments and designed Fig. 3 and 5. M.L. and L.B. have designed bioinformatic methods to help compare transcriptomic data published in the literature and contributed to the design of Fig. 6. In addition, authors wish to thank Samia Aci for molecular dynamic simulations used for the illustration in Fig. 4.

References

- J. Jouhet, E. Marechal and M. A. Block, *Prog. Lipid Res.*, 2007, **46**, 37–55.
- J. Joyard, E. Teyssier, C. Miegé, D. Berny-Seigneurin, E. Marechal, M. A. Block, A. J. Dorne, N. Rolland, G. Ajlani and R. Douce, *Plant Physiol.*, 1998, **118**, 715–723.
- J. Jouhet, E. Dubots, E. Maréchal and M. A. Block, in *Lipids in photosynthesis*, ed. H. Wada and N. Murata, Springer, Dordrecht, 2010, vol. 30, pp. 349–372.
- A. P. Brown, A. R. Slabas and J. B. Rafferty, in *Lipids in photosynthesis*, ed. H. Wada and N. Murata, Springer, Dordrecht, 2010, vol. 30, pp. 11–34.
- Y. Li-Beisson, B. Shorrosh, F. Beisson, M. X. Andersson, V. Arondel, P. D. Bates, S. Baud, D. Bird, A. DeBono, T. P. Durrett, R. B. Franke, I. A. Graham, K. Katayama, A. A. Kelly, T. Larson, J. E. Markham, M. Miquel, I. Molina, I. Nishida, O. Rowland, L. Samuels, K. M. Schmid, H. Wada, R. Welti, C. Xu, R. Zallot and J. Ohlrogge, in *The Arabidopsis Book*, The American Society of Plant Biologists, Washington, 2010, vol. 8, pp. 1–65.
- J. Joyard, M. Ferro, C. Masselon, D. Seigneurin-Berny, D. Salvi, J. Garin and N. Rolland, *Prog. Lipid Res.*, 2010, **49**, 128–158.
- C. Benning, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2009, **25**, 71–91.
- E. Heinz and P. G. Roughan, *Plant Physiol.*, 1983, **72**, 273–279.
- A. J. Dorne, J. Joyard, M. A. Block and R. Douce, *J. Cell Biol.*, 1985, **100**, 1690–1697.
- E. Dubots, C. Botté, L. Boudière, Y. Yamaryo-Botté, J. Jouhet, E. Maréchal and M. A. Block, *Biochimie*, 2012, **94**, 86–93.
- H. Aronsson, M. A. Schottler, A. A. Kelly, C. Sundqvist, P. Dormann, S. Karim and P. Jarvis, *Plant Physiol.*, 2008, **148**, 580–592.
- E. Schleiff, J. Soll, M. Kuchler, W. Kuhlbrandt and R. Harrer, *J. Cell Biol.*, 2003, **160**, 541–551.
- K. Kobayashi, H. Fukuda, S. Baba, M. Kondo, M. Nishimura, K. Takamiya and H. Ohta, *Plant Cell Physiol.*, 2006, **47**, S32.
- A. A. Kelly, J. E. Froehlich and P. Dormann, *Plant Cell*, 2003, **15**, 2694–2706.
- C. C. Xu, B. Yu, A. J. Cornish, J. E. Froehlich and C. Benning, *Plant J.*, 2006, **47**, 296–309.
- J. Ohlrogge and J. Browse, *Plant Cell*, 1995, **7**, 957–970.
- K. Awai, E. Marechal, M. A. Block, D. Brun, T. Masuda, H. Shimada, K. Takamiya, H. Ohta and J. Joyard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**, 10960–10965.
- E. Marechal, M. A. Block, J. Joyard and R. Douce, *C. R. Acad. Sci., Ser. III*, 1991, **313**, 521–528.
- E. Marechal, M. A. Block, J. Joyard and R. Douce, *FEBS Lett.*, 1994, **352**, 307–310.
- E. Marechal, M. A. Block, J. Joyard and R. Douce, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 5788–5798.
- E. Marechal, C. Miegé, M. A. Block, R. Douce and J. Joyard, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 5714–5722.
- C. Miegé, E. Marechal, M. Shimajima, K. Awai, M. A. Block, H. Ohta, K. Takamiya, R. Douce and J. Joyard, *Eur. J. Biochem.*, 1999, **265**, 990–1001.
- C. Li, Y. Wang, L. Liu, Y. Hu, F. Zhang, S. Mergen, G. Wang, M. R. Schlappi and C. Chu, *PLoS Genet.*, 2011, **7**, e1002196.
- P. Jarvis, P. Dormann, C. A. Peto, J. Lutes, C. Benning and J. Chory, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**, 8175–8179.
- K. Kobayashi, M. Kondo, H. Fukuda, M. Nishimura and H. Ohta, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 17216–17221.
- K. Kobayashi, K. Awai, M. Nakamura, A. Nagatani, T. Masuda and H. Ohta, *Plant J.*, 2009, **57**, 322–331.
- K. Gounaris and J. Barber, *Trends Biochem. Sci.*, 1983, **8**, 378–381.
- C. Y. Botte, M. Deligny, A. Roccia, A. L. Bonneau, N. Saidani, H. Hardre, S. Aci, Y. Yamaryo-Botte, J. Jouhet, E. Dubots, K. Loizeau, O. Bastien, L. Brehelin, J. Joyard, J. C. Cintrat, D. Falconet, M. A. Block, B. Rousseau, R. Lopez and E. Marechal, *Nat. Chem. Biol.*, 2011, **7**, 834–842.
- P. Dormann, S. Hoffmannbenning, I. Balbo and C. Benning, *Plant Cell*, 1995, **7**, 1801–1810.
- C. Benning and H. Ohta, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 2397–2400.
- A. Youssef, Y. Laizet, M. A. Block, E. Marechal, J. P. Alcaraz, T. R. Larson, D. Pontier, J. Gaffe and M. Kuntz, *Plant J.*, 2010, **61**, 436–445.
- A. Andreou, F. Brodhun and I. Feussner, *Prog. Lipid Res.*, 2009, **48**, 148–170.
- A. Ibrahim, A. L. Schütz, J. M. Galano, C. Herrfurth, K. Feussner, T. Durand, F. Brodhun and I. Feussner, *Front. Plant Sci.*, 2011, **2**, 95.
- H. S. Vu, P. Tamura, N. A. Galeva, R. Chaturvedi, M. R. Roth, T. D. Williams, X. Wang, J. Shah and R. Welti, *Plant Physiol.*, 2012, **158**, 324–339.
- A. van Besouw and J. F. Wintermans, *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, **529**, 44–53.
- J. W. M. Heemskerk, J. F. G. M. Wintermans, J. Joyard, M. A. Block, A. J. Dorne and R. Douce, *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, **877**, 281–289.

- 37 E. R. Moellering, B. Muthan and C. Benning, *Science*, 2010, **330**, 226–228.
- 38 E. R. Moellering and C. Benning, *Trends Plant Sci.*, 2011, **16**, 98–107.
- 39 J. Jouhet, E. Marechal, R. Bligny, J. Joyard and M. A. Block, *FEBS Lett.*, 2003, **544**, 63–68.
- 40 J. Misson, K. G. Raghothama, A. Jain, J. Jouhet, M. A. Block, R. Bligny, P. Ortet, A. Creff, S. Somerville, N. Rolland, P. Doumas, P. Nacry, L. Herrerra-Estrella, L. Nussaume and M. C. Thibaud, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 11934–11939.
- 41 R. Morcuende, R. Bari, Y. Gibon, W. M. Zheng, B. D. Pant, O. Blasing, B. Usadel, T. Czechowski, M. K. Udvardi, M. Stitt and W. R. Scheible, *Plant, Cell Environ.*, 2007, **30**, 85–112.
- 42 K. Awai, C. C. Xu, B. Tamot and C. Benning, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**, 10817–10822.
- 43 Z. Wang, C. Xu and C. Benning, *Plant J.*, 2012, **70**, 614–623.
- 44 R. Roston, J. Gao, C. Xu and C. Benning, *Plant J.*, 2011, **66**, 759–769.
- 45 Y. Nakamura, R. Koizumi, G. Shui, M. Shimojima, M. R. Wenk, T. Ito and H. Ohta, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**, 20978–20983.
- 46 H. Hartel and C. Benning, *Biochem. Soc. Trans.*, 2000, **28**, 729–732.
- 47 H. Hartel, P. Dormann and C. Benning, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**, 10649–10654.
- 48 M. X. Andersson, M. H. Stridh, K. E. Larsson, C. Liljenberg and A. S. Sandelius, *FEBS Lett.*, 2003, **537**, 128–132.
- 49 M. X. Andersson, K. E. Larsson, H. Tjellstrom, C. Liljenberg and A. S. Sandelius, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 27578–27586.
- 50 J. Jouhet, E. Marechal, B. Baldan, R. Bligny, J. Joyard and M. A. Block, *J. Cell Biol.*, 2004, **167**, 863–874.
- 51 H. Tjellstrom, M. X. Andersson, K. E. Larsson and A. S. Sandelius, *Plant, Cell Environ.*, 2008, **31**, 1388–1398.
- 52 C. Benning, *Prog. Lipid Res.*, 2008, **47**, 381–389.
- 53 G. Holz, S. Witt, A. A. Kelly, U. Zahringer, D. Warnecke, P. Dormann and E. Heinz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**, 7512–7517.
- 54 G. Holz, S. Witt, N. Gaude, M. Melzer, M. A. Schottler and P. Dormann, *Plant Physiol.*, 2009, **150**, 1147–1159.
- 55 C. Benning, C. C. Xu, K. Awai, B. B. Lu and J. P. Gao, *FASEB J.*, 2007, **21**, A37.
- 56 S. Mongrand, J. J. Bessoule, F. Cabantous and C. Cassagne, *Phytochemistry*, 1998, **49**, 1049–1064.
- 57 E. Dubots, M. Audry, Y. Yamaryo, O. Bastien, H. Ohta, E. Marechal and M. A. Block, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 6003–6011.
- 58 E. Dubots, C. Botté, L. Boudière, Y. Yamaryo-Botté, J. Jouhet, E. Marechal and M. A. Block, *Biochimie*, 2012, **94**, 86–93.
- 59 C. Botte, C. Jeanneau, L. Snajdrova, O. Bastien, A. Imbert, C. Breton and E. Marechal, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 34691–34701.
- 60 Y. Nishiyama, H. Hardre-Lienard, S. Miras, C. Miede, M. A. Block, F. Revah, J. Joyard and E. Marechal, *Protein Expression Purif.*, 2003, **31**, 79–87.
- 61 A. van Besouw and J. F. Wintermans, *FEBS Lett.*, 1979, **102**, 33–37.
- 62 J. Coves, M. A. Block, J. Joyard and R. Douce, *FEBS Lett.*, 1986, **208**, 401–406.
- 63 J. Coves, J. Joyard and R. Douce, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1988, **85**, 4966–4970.
- 64 K. Kobayashi, K. Awai, K. Takamiya and H. Ohta, *Plant Physiol.*, 2004, **134**, 640–648.
- 65 Y. Nakamura, K. Kobayashi and H. Ohta, *Plant Physiol. Biochem.*, 2009, **47**, 535–539.
- 66 U. C. Voithknecht, S. Otters, R. Hennig and D. Schneider, *J. Exp. Bot.*, 2012, **63**, 1699–1712.
- 67 K. Kobayashi, Y. Nakamura and H. Ohta, *Plant Physiol. Biochem.*, 2009, **47**, 518–525.
- 68 H. Tjellstrom, L. I. Hellgren, A. Wieslander and A. S. Sandelius, *FASEB J.*, 2010, **24**, 1128–1138.
- 69 M. A. Russo, M. F. Quartacci, R. Izzo, A. Belligno and F. Navari-Izzo, *Phytochemistry*, 2007, **68**, 1564–1571.
- 70 Y. Nakamura, H. Arimitsu, Y. Yamaryo, K. Awai, T. Masuda, H. Shimada, K. Takamiya and H. Ohta, *Lipids*, 2003, **38**, 1107–1112.
- 71 M. Shimojima and H. Ohta, *Prog. Lipid Res.*, 2011, **50**, 258–266.
- 72 S. Masuda, J. Harada, M. Yokono, Y. Yuzawa, M. Shimojima, K. Murofushi, H. Tanaka, H. Masuda, M. Murakawa, T. Haraguchi, M. Kondo, M. Nishimura, H. Yuasa, M. Noguchi, H. Oh-Oka, A. Tanaka, H. Tamiaki and H. Ohta, *Plant Cell*, 2011, **23**, 2644–2658.
- 73 M. Q. Cotter, N. D. Teaster, E. B. Blancaflor and K. D. Chapman, *Plant Signaling Behav.*, 2011, **6**, 671–679.
- 74 N. D. Teaster, J. Keereetawee, A. Kilaru, Y. S. Wang, Y. Tang, C. N. Q. Tran, B. G. Ayre, K. D. Chapman and E. B. Blancaflor, *Front. Plant Sci.*, 2012, **3**, 32.
- 75 K. Lorenc-Kukula, R. Chaturvedi, M. Roth, R. Welti and J. Shah, *Front. Plant Sci.*, 2012, **3**, 26.
- 76 M. C. Thibaud, J. F. Arrighi, V. Bayle, S. Chiarenza, A. Creff, R. Bustos, J. Paz-Ares, Y. Poirier and L. Nussaume, *Plant J.*, 2010, **64**, 775–789.
- 77 K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2000, **3**, 217–223.
- 78 K. Maruyama, D. Todaka, J. Mizoi, T. Yoshida, S. Kidokoro, S. Matsukura, H. Takasaki, T. Sakurai, Y. Y. Yamamoto, K. Yoshiwara, M. Kojima, H. Sakakibara, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki, *DNA Res.*, 2012, **19**, 37–49.
- 79 M. L. Torres-Franklin, A. Gigon, D. F. de Melo, Y. Zuily-Fodil and A. T. Pham-Thi, *Physiol. Plant.*, 2007, **131**, 201–210.
- 80 C. Ge, A. Georgiev, A. Ohman, A. Wieslander and A. A. Kelly, *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**, 6669–6684.
- 81 A. P. Girard-Egrot, S. Godoy and L. J. Blum, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2005, **116**, 205–225.



Review

Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis

Emmanuelle Dubots¹, Cyrille Botté, Laurence Boudière, Yoshiki Yamaryo-Botté, Juliette Jouhet, Eric Maréchal, Maryse A. Block*

Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, UMR 5168, CNRS, CEA, INRA, Université Joseph Fourier Grenoble I, Institut de Recherches en Sciences et Technologies pour le Vivant, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 February 2011

Accepted 31 March 2011

Available online 12 April 2011

Keywords:

Phosphatidic acid

Lipid metabolism

Plant development

Galactolipid

Photosynthesis

Apicomplexa

ABSTRACT

Phosphatidic acid (PA) is a precursor metabolite for phosphoglycerolipids and also for galactoglycerolipids, which are essential lipids for formation of plant membranes. PA has in addition a main regulatory role in a number of developmental processes notably in the response of the plant to environmental stresses. We review here the different pools of PA dispatched at different locations in the plant cell and how these pools are modified in different growth conditions, particularly during plastid membrane biogenesis and when the plant is exposed to phosphate deprivation. We analyze how these modifications can affect galactolipid synthesis by tuning the activity of MGD1 enzyme allowing a coupling of phospho- and galactolipid metabolisms. Some mechanisms are considered to explain how physicochemical properties of PA allow this lipid to act as a central internal sensor in plant physiology.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

In plants, phosphatidic acid (PA) is both a metabolic precursor for all glycerolipids and a key signalling lipid that regulates numerous reactions involved in developmental and physiological processes particularly in response to environmental stresses. Several pools of PA are involved, associated with different cell membranes. Some of these sources of PA represent potential precursor supplies for synthesis of galactoglycerolipids, which are the main glycerolipids of plants and the focus of the present review.

One of the specificities of the plant cells is indeed their high content in galactolipids. In plastids, a family of plant specific organelles including the chloroplast, MGDG (monogalactosyldiacylglycerol) and DGDG (digalactosyldiacylglycerol) represent together close to 80% of membrane lipids. In chloroplasts, MGDG and DGDG are essential for photosynthesis. Galactolipids are mainly restricted to plastid membranes, however, when the plant grows under Pi restriction, DGDG can replace phospholipids in some non-plastid membranes such as the tonoplast, the plasma

membrane and the mitochondrial membrane and thus represents a major lipid at the whole cell level. This spectacular lipid remodelling represents a way to save Pi for other cell functions. The role of galactolipids for cellular membrane remodelling under Pi deprivation is another indication of the vital importance of galactolipids for plants.

Galactolipid formation is initiated by the transfer of a galactose from UDP-galactose onto diacylglycerol. This step is catalyzed by MGDG synthases (which in Arabidopsis are AtMGD1, AMGD2, AtMGD3) located in the plastid envelope [1]. Diacylglycerol supplied to MGDG synthases results from hydrolysis of PA and recent investigations indicate that in the chloroplast envelope MGD1 is activated by PA [2]. In the chloroplast envelope, PA is also the precursor for the synthesis of phosphatidylglycerol, PG, a phospholipid, which is another essential component of the chloroplast membranes [3]. In this context it is important to understand and connect the distinct roles of PA as an intermediate metabolite in formation of the plant cell membranes and as a mediator in the transduction of signal in a series of physiological contexts. We will here inventory the different steps where PA is involved in the galactolipid synthetic pathway. We will focus on the photosynthetic plant cell and give a brief report on some recently investigated parasites of medical importance, i.e. the Apicomplexans, which happen to harbour a non-photosynthetic plastid, the apicoplast [4–6]. We will then consider how PA can connect galactolipid synthesis with basic functions of the plant cell.

* Corresponding author. CEA-Grenoble, iRTSV/LPCV, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France. Tel.: +33 (0) 438 78 49 85; fax: +33 (0) 438 78 50 91.

E-mail address: mblock@cea.fr (M.A. Block).

¹ Present address: Biochemistry Unit, Department of Biology, University of Fribourg, CH-1700 Fribourg, Switzerland.

2. Levels of phosphatidic acid in plant cells

In leaves, PA generally represents 1–5 mol % of total glycerolipids but in some stress conditions the concentration can highly increase [7]. In available reports, PA levels are not always expressed as a mol percentage of total membrane lipids limiting the precision of the comparison, but the magnitude of variations looks nevertheless always important. An increase of PA from 1.2 to 11.5 nmol per mg of dry weight (9.6 fold increase) was reported in rosettes of preflowering *Arabidopsis* plants exposed to freezing [8]. Similarly, an increase of PA from 5 to 25 mol % of phospholipids (5 fold increase) was reported in leaves of tomato and *Arabidopsis* plants treated with high concentration of NaCl mimicking a drought stress [9] and an increase of PA from 0.5 to 4 mol % of total glycerolipids (8 fold increase) was detected in *Arabidopsis* cells at early steps of phosphate deprivation [Jouhet, personal communication].

Different molecular species of PA are present. They are composed of C16 and C18 fatty acids with up to 3 double bonds. The main molecular species are usually 34:2 and 34:3 (indicating total number of fatty acyl carbons: total number of double bonds in fatty acids, as often reported in identification obtained by mass spectrometry) but in some stresses highly unsaturated diacyls such as 36:5 or 36:6 can also appear as the main molecular species [7,10]. Lipid analysis of PLD mutants exposed to stresses led to the conclusion that these PA species are diC18 species and derive primarily from PC [8]. In plants exposed to cold stress, detection of

PA enriched in C16:3 [8], a typical fatty acid of MGDG, suggests that some molecular species of PA can derive from MGDG.

PA is heterogeneously distributed in the different cellular membranes. The plasma membrane is enriched in PA (3–4 mol % of lipids [11]) whereas, in the chloroplast membranes, PA is very low, never detected in the chloroplast envelope, and around 0.1 mol % of lipids in tobacco thylakoids as reported by [12]. The authors detected mainly a form of PA with C18:1 at *sn*-1 and C16:0 at *sn*-2 position of glycerol, which is considered as a prokaryotic form of glycerolipid typically synthesized in chloroplasts as we will see below.

3. Phosphatidic acid as an intermediate metabolite in galactolipid synthesis

PA is produced by a collection of enzymes (see Fig. 1 and Table 1). The neo-synthesis of PA goes through a two step acylation of glycerol-3-P with lyso-PA as an intermediate. These two acylation-steps are more generally the basic way to the *de novo* formation of phosphoglycerolipids and galactoglycerolipids and PA is therefore an obligate early precursor in synthesis of all glycerolipids. In plants, acylation of glycerol-3-P occurs in three membrane compartments: the ER, the mitochondrial membranes, and the chloroplast envelope. We will not detail here the characteristics of mitochondrial acyltransferases but information can be found in [13]. One point to note is that the mitochondrial

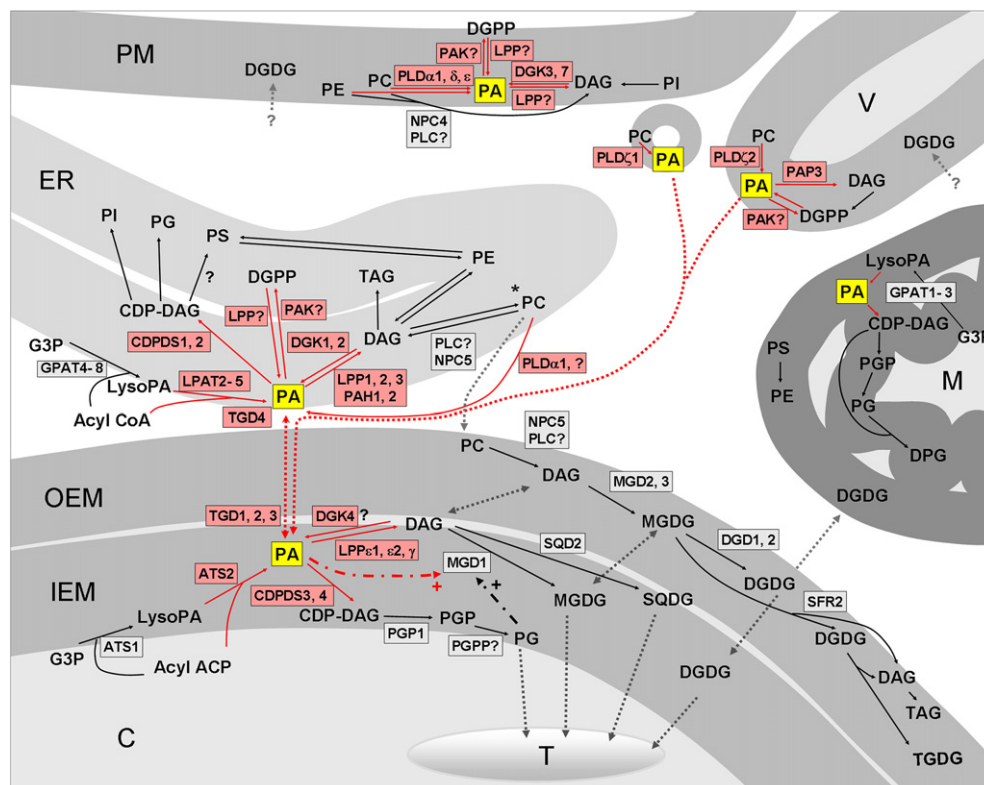


Fig. 1. Origin and fate of the different pools of PA in the plant cell. Several pools of PA are dispatched in the different cell membranes. Different molecular species of PA are present depending of enzyme specificity and substrate availability. For the most part PA is converted to either DAG or CDP-DAG. Balance between the 2 pathways is dependent on the ratio of the activities of the PA phosphatases and the CDP-DAG synthases. CDP-DAG and DAG are substrates in formation of phospholipids and galactolipids [14]. DAG can also generate TAG ([83,84]). Conversion to DGPP is an alternative although likely less abundant route [85]. Some DAG kinases produce PA possibly even in plastids since some sequences harbour a putative chloroplast transit peptide. PA can modify the activity of some target proteins including several enzymes involved in the lipid synthesis pathways such as the MGDG synthase, MGD1, in the chloroplast envelope and the soluble phosphoethanolamine N-methyltransferase, PEAMT (indicated by * in the scheme), involved in PC synthesis [2,80]. Demonstrations that specific sources of PA are active at another cell location indicate that PA can be transported between membranes (see [2,26]). Enzymes directly related with PA, either producing PA or using PA, are indicated in red. Lipid transports are indicated by a dotted line and activation by a semi-dashed line. Lipid enzymes are listed in Table 1. Abbreviations: PM, plasma membrane; ER, endoplasmic reticulum; V, vacuole; C, chloroplast; T, thylakoids; OEM, outer envelope membrane; IEM, inner envelope membrane. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1
Lipid enzymes presented in Fig. 1. Enzyme location refers to [77] when available or to TAIR. For level changes in gene expression under Pi deprivation abbreviations are NR: Not reported, NC: No change, NM: Not in microarray, – or +: 1.5–2 fold change range, -- or ++: >2 fold change range.

Name	Activity	Location	Gene expression under Pi deprivation			Arabidopsis locus
			According to [20]		According to [21]	
			Leaf	Root	Whole seedling	
ATS1	Glycerol-3-phosphate acyltransferase	Chloroplast	NR	NR	NC	At1g32200
ATS2	Lyso-PA acyltransferase	IEM	NR	NR	--	At4g30580
CDPDS1	CDP-DAG synthase	ER	NR	NR	+	At1g62430
CDPDS2			NR	NR	NC	At4g22340
CDPDS3		IEM	NR	NR	NC	At4g26770
CDPDS4			NR	NR	–	At2g45150
DGD1	DGDG synthase	OEM	++	NR	++	At3g11670
DGD2			NR	++	++	At4g00550
DGK1	DAG kinase	ER	NR	NR	NC	At5g07920
DGK2			NR	NR	NC	At5g63770
DGK3		PM	NR	NR	+	At2g18730
DGK7			NR	NR	NC	At4g30340
DGK4		Chloroplast?	NR	NR	NC	At5g57690
GPAT1	Glycerol-3-phosphate acyltransferase	Mitochondria?	NR	NR	–	At1g06520
GPAT2			++	NR	++	At1g02390
GPAT3			NR	NR	NC	At4g01950
GPAT4		ER?	NR	NR	+	At1g01610
GPAT5			NR	NR	++	At3g11430
GPAT6			NR	NR	+	At2g38110
GPAT7			NM	NM	NM	At5g06090
GPAT8			NR	NR	--	At4g00400
LPP1	PA phosphatase	ER, PM?	NR	NR	NC	At2g01180
LPP2			NR	NR	NC	At1g15080
LPP3			NR	NR	NC	At3g02600
LPPe1		IEM	NR	NR	NC	At3g50920
LPPe2			NM	NM	NM	At5g66450
LPPγ			NR	NR	NC	At5g03080
LPAT2	Lyso-PA acyltransferase	ER	NR	NR	NC	At3g57650
LPAT3			NR	NR	NC	At1g51260
LPAT4			NR	NR	+	At1g75020
LPAT5			NR	NR	–	At3g18850
MGD1	MGDG synthase	IEM	NR	NR	++	At4g31780
MGD2		OEM	++	++	++	At5g20410
MGD3		OEM	++	++	++	At2g11810
NPC4	Phospholipase C	PM	NM	NM	NM	At3g03530
NPC5		Cytosol	++	++	++	At3g03540
PAH1	PA phosphohydrolase	ER	NR	NR	++	At3g09560
PAH2			NR	NR	NC	At5g42870
PAK	PA kinase	PM, ER,	NR	NR	NC	At1g12430
PAP3	PA phosphatase	Vacuole	--	NR	--	At1g14700
PGP1	Phosphatidylglycerolphosphate synthase	IEM, Mitochondria	NR	NR	NC	At2g39290
PLDα1	Phospholipase D	PM, Cytosol	NR	NR	NC	At3g15730
PLDδ			NR	NR	NC	At4g35790
PLDe			NR	NR	NC	At1g55180
PLDζ1		Vesicles under PM	NR	NR	NC	At3g16785
PLDζ2		Vacuole	++	++	++	At3g05630
SFR2	Galactolipid:galactolipid galactosyl-transferase	OEM	NR	NR	NC	At3g06510
TGD1	Lipid transport	Chloroplast envelope	NR	NR	NC	At1g19800
TGD2			NR	NR	NC	At3g20320
TGD3			NR	NR	NC	At1g65410
TGD4		ER	NR	NR	NC	At3g06960

acyltransferases play a role in formation of DPG (cardiolipin), a specific mitochondrial lipid.

The ER glycerol-3-P and lyso-PA acyltransferases are involved in formation of most phospholipids: PC (phosphatidylcholine), PE (phosphatidylethanolamine), PI (phosphatidylinositol), PS (phosphatidylserine), and part of the cellular PG (phosphatidylglycerol) [14]. Furthermore, since about half of the galactolipids derive from ER-synthesized PC (referred to as eukaryotic galactolipids) these acyltransferases also display a role in formation of galactolipids. In fact a complex network of lipid synthetic pathways is issued from these acyltransferases and regulation between the different branches appears as essential. In *Arabidopsis*, *LPAT2* encodes

a ubiquitous ER-located lyso-PA-acyl CoA acyltransferase that is vital for the plant [15]. There are several other ER acyltransferases but all are not as important as *LPAT2*; for instance deletion of *LPAT3* which is expressed in the male gametophyte does not display a lethal phenotype [15]. PA formed by ER acyltransferases can generate phospholipids via 2 different pathways: i) the CDP-DAG pathway and ii) the Kennedy pathway through dephosphorylation of PA into DAG. In yeast, both pathways generate PC and PE [16]. The CDP-DAG pathway is more active in the growth phase but nutrient depletion induces a shift towards the Kennedy pathway [16]. The Kennedy pathway indeed contributes to recycling the polar head of phospholipids such as choline and ethanolamine

through phospholipases D (PLDs) and eventually to remodelling of membranes. The PA phosphatase Pah1p is critical for the shift from the CDP-DAG to the Kennedy pathway because it catalyzes the hydrolysis of PA into DAG, and furthermore because the Pah1p-produced DAG negatively regulates the level of expression of genes encoding the CDP-DAG pathway [16]. In plants, the biosynthetic pathways show similarity with yeast but also major differences partly related with galactolipid synthesis. The Kennedy pathway is preferentially used for formation of PC and PE and the CDP-DAG pathway for formation of PI, PG and probably PS (Fig. 1) [14]. Arabidopsis enzymes similar to the yeast Pah1p, AtPAH1 and AtPAH2, also control phospholipid synthesis but through a different system [17]. In the KO double mutant, *pah1pah2*, the expression of several other enzymes of the Kennedy pathway including the phosphoethanolamine N-methyltransferase PAEMT1 that catalyzes the first committed step of choline synthesis is enhanced as well as the rate of incorporation of choline into PC. These results indicate that activation of PAHs leads to inhibition of PC and PE syntheses. Interestingly, when plants are deprived of Pi, AtPAH1 and AtPAH2 activities are enhanced and AtPAHs contribute to the Pi restriction response by recycling of phospholipids into galactolipids [17,18]. However, it is likely important to distinguish two phases in the lipid response to Pi deprivation. In an early stage, a transient increase of PC precedes the increase of galactolipid synthesis [19] and several phospholipases D and C such as PLD ζ 1, PLD ζ 2, NPC4 and NPC5 are highly overexpressed [20,21]. Therefore, this suggests that, at this stage, the Kennedy pathway actively contributes to remodelling of phospholipids, notably of PE into PC [19]. This suggests that AtPAH1 and AtPAH2 are activated only after this stage, when galactolipid synthesis starts to increase. In this second stage, PLD ζ 1, PLD ζ 2 and NPC5 contribute to the recycling of DAG for galactolipid synthesis as was shown by mutant analysis [22–24]. The question is then how the eukaryotic DAG is imported into the chloroplast to reach the site of MGDG synthesis (Fig. 1). Several modes of transport have been proposed, mainly by relocation of PC, lyso-PC, DAG and/or PA (see [25]). A multimeric ABC transporter composed of three subunits, TGD1, TGD2 and TGD3, located to the chloroplast envelope, and probably associated with a fourth ER protein, TGD4, contributes to this import since TGD mutations strongly impair formation of the eukaryotic galactolipids [26]. Observation that the TGD2 subunit binds to PA [27] indicates that PA displays a role in the functioning of this complex but it is not yet clear how the complex works and whether PA is the only transported metabolite.

In chloroplasts, two different acyltransferases called ATS1 and ATS2 are involved in successive acylation of glycerol-3-P leading to formation of PA. ATS1 is specific for C18:1 chain at *sn*-1 position on glycerol-3-P [28] and ATS2, a chloroplast inner envelope protein, is specific for C16:0 chain [29–31]. Typical structure of PA is thus C18:1-*sn*-1, C16:0-*sn*-2, which is the characteristic prokaryotic structure found in chloroplast PG and in about half of the galactolipids (those are called prokaryotic galactolipids). PA is then either converted to CDP-diacylglycerol before incorporation into plastid PG, or it is converted to DAG by typical chloroplast envelope PA phosphatases before incorporation into galactolipids or sulfoquinovosyldiacylglycerol SQDG (Fig. 1). The vital importance of prokaryotic PA synthesis was indicated by invalidation of *ATS2* gene, which gives an embryo development arrest at the stage of chloroplast formation [31,32]. In contrast, although a series of *ats1* mutants showed a strong impaired phenotype, the plants remained viable, probably due to a residual activity of ATS1 from RNAi invalidation, point mutations or partial sequence deletions [33]. Detailed lipid analysis from *ats1* mutant indicated a complete loss of prokaryotic galactolipids and only a partial loss of chloroplast PG. This difference suggests that, when prokaryotic PA is supplied in limited amount, plastid PG synthesis is dominant over prokaryotic

galactolipid synthesis, possibly because CDPDS has a higher affinity to PA than PA phosphatase. Like for the branching between CDP-DAG and Kennedy pathways in the ER, PA phosphatase plays an essential role in the branching between PG and galactolipid synthesis in the envelope. A typical chloroplast envelope PA phosphatase has been described in the past [34]. This enzyme is tightly associated with the inner envelope membrane [35,36]. In contrast to most PA phosphatases, it shows an alkaline optimum pH, a severe inhibition by Mg^{2+} suggesting a link with photosynthetic activity and a strong feedback inhibition by DAG suggesting that PA hydrolysis and galactolipid synthesis are coupled in the membrane. Three genes encoding chloroplast PA phosphatases have been identified in *Arabidopsis*: LPP γ , LPP ϵ 1, and LPP ϵ 2 [37]. Depletion of the LPP γ led to a lethal mutant, whereas no phenotype was detected in the double knock out mutant *lpp ϵ 1lpp ϵ 2*. This suggests that either a specific pool of PA dephosphorylated by LPP γ or a specific pool of DAG produced by LPP γ plays a determinant role for the plant, indicating a need for analysis of substrate specificity of LPP γ .

Altogether, PA is an intermediate in numerous steps of galactolipid synthesis dispatched in the different membranes of the plant cell (Fig. 1). Although the lipid neosynthetic pathways are apparently redundant in several parts, it appears very frequently that, at each PA-involving step, deletion of several specific enzymes leads to a lethal phenotype. It is therefore likely that PA produced by these enzymes has specific properties that interfere with signalling processes. These properties should be related with fatty acid composition and localisation of PA. The transient localisation in a specific membrane spot and the activation of interaction capability with neighbouring components must be keys in the process.

4. Is phosphatidic acid a central precursor for vital lipid synthesis in Apicomplexa, animal parasites with a relict plastid?

Apicomplexa is a phylum of obligate intracellular parasites, including pathogens of medical importance such as the causative agent of malaria, *Plasmodium* spp. These unicellular eukaryotes harbour a non-photosynthetic plastid, the apicoplast, which is involved in vital metabolic pathways, one of them being lipid biosynthesis [4,38,39]. The demand in lipids required for parasite maintenance is met by combination of scavenging fatty acids from their host and *de novo* synthetic pathway [40]. PA is most likely to play a central part in the regulation between the different lipid fluxes. PA can be synthesized by the classical *de novo* two-steps acylation pathway within two compartments, the ER and the apicoplast. A glycerol-3-P acyltransferase, PfGPAT (PFL0620c) was characterized in *Plasmodium falciparum* ER, exhibiting a strong affinity for C16:0 and C16:1 [41]. Attempt to disrupt PfGPAT were unsuccessful suggesting an essential role of the protein. Regarding the apicoplast lipid synthesis pathway, it is well established that the prokaryotic type II fatty acid synthesis (FASII) is essential for Apicomplexa [42,43]. Homologues of chloroplast ATS1 and ATS2, PfATS1 and PfATS2, were predicted as apicoplast proteins in *P. falciparum* [39]. Furthermore, PfATS1 is a soluble apicoplast protein with an acyltransferase activity (C. Botté, personal communication) making the apicoplast a plausible site for PA neo-synthesis. However, nothing is known on the exact fate of the neo-synthesized PA. The apicoplast lipid composition remains unknown but synthesis of galactolipids could be detected by metabolic labelling in Apicomplexa lysates [44,45]. Immunodetection using a polyclonal antibody raised against plant DGDG allowed to detect a digalactolipid-like epitope in *Toxoplasma gondii* (the Apicomplexa responsible for toxoplasmosis) and *P. falciparum* membranes and total lipid extracts [45,46]. Furthermore LC–MS/

MS approach showed the presence of two hexosyllipids in the membranes of *T. gondii*: hexosylceramides and hexosylglycerolipids, hexosylceramides being the most predominant class [46]. Together, these data are consistent with the potential synthesis of galactolipid classes in Apicomplexa by a pathway, which remains to be identified. Therefore prokaryotic PA could serve as a possible precursor for the synthesis of phospholipids and galactolipids. Due to the essentiality of the apicoplast for Apicomplexa and its plants origin, it would be important to investigate the apicoplast enzymes involved in the synthesis of PA for potential medical intervention.

5. Mode of action of phosphatidic acid in signalling events

PA is the simplest phospholipid but unlike other phospholipids, the phosphate head group of PA is a monoester and has a second pKa usually between 6.6 and 7.9 depending of the PA environment [47,48]. PA can thus carry one or two negative charges. Micromolar concentration of cations such as Ca^{2+} or Mg^{2+} at the bilayer surface can modify the charge of PA and the way it interacts with the membrane environment [49,50]. Since local concentration of Ca^{2+} and Mg^{2+} can fluctuate very rapidly in particular cellular condition, this chemical property of PA is an important feature to probe its environment. As a consequence PA can behave as a pH biosensor as notably reported in yeast for regulation of expression of phospholipid metabolic genes through PA-dependent sequestration in the ER of the transcription factor Opi1p [16,51,52]. Interestingly it has been recently demonstrated that during the first minutes of carbon deprivation the cytosolic pH of plant cells rises from 7.4 to stabilize at 7.8 and recovers to more acidic pH within 5 min after carbon repletion accompanying modification of level of soluble phosphorous metabolites [53]. The authors proposed that modification of cytosolic pH likely occurs also in response to Pi deprivation. Since enzymatic studies of galactolipid synthesizing enzymes showed different protonation levels of peripheral histidine residues interacting with cations in a 6–8 pH range [54–56], one may question about the consequences on galactolipid synthesis.

The reduced size of its polar head confers to PA a cone shape, which can be amplified by desaturation of the fatty acyl chains. Because of this cone shape, accumulation of PA in a leaflet of a bilayer favours concave (negative) curvature of the membrane

[57]. The change in PA concentration can have central consequences on membrane trafficking. It has been shown in mammal chromaffin secretory cells that accumulation of PLD-produced PA at the inner leaflet of the plasma membrane causes a curvature which favours the fusion of the membrane with the contacting membrane of secretory vesicles [58,59]. The fusion was reproduced in PLD deficient cells by exogenous addition of lyso-PC at the outer leaflet of the plasma membrane. Among the twelve PLDs recorded in Arabidopsis, PLD ζ 1 and PLD ζ 2 are homologous to mammal PLDs and play a role in the formation of galactolipids induced by Pi deprivation [22,23]. Interestingly, PLD ζ 2 has been shown to be also involved in root system architecture, auxin-dependent hypocotyl elongation and vesicle cycling [60,61]. PLD ζ 1 has been localized in vesicles underlying the plasma membrane [62] and PLD ζ 2 in the tonoplast [63], which suggests that they hydrolyze specific pools of phospholipids in the endomembrane system. At an early stage of Pi deprivation a transient increase of PLD ζ 2-enriched domains has been observed in tonoplast [63]. These domains are close to mitochondria and chloroplasts whose contacts are themselves increased at this stage and concomitant with galactolipid transfer from chloroplasts to mitochondria [19,64]. On the model of what has been observed in mammal cells, one can propose that PLD ζ 2-produced PA can facilitate hemifusion of membranes and eventually remodelling of lipids between tonoplast, chloroplasts and mitochondria.

PA can modify conformation of proteins leading to changes in the cell biology. Several target proteins have been identified in plants (Table 2). Some targets are protein kinases, protein phosphatases and G proteins. They belong to signalling cascades involved in the abscisic acid signalling (i.e. ABI1 [65]), the ethylene signalling (i.e. CTR1 [66]), the salt stress response (i.e. MPK6 [67]) or the development of tissue (i.e. PDK1 [68]). Some others are related with the cytoskeleton such as the actin cap protein AtCP [69]. PA binding can induce a cascade of changes not only on membrane proteins but also in the surrounding domain inside the membrane [70]. Providing insight into the local chemistry and environments of functional groups within a molecule, FTIR difference spectrometry has been used to monitor the structural changes induced in a membrane by interaction of PA with a nicotinic acetylcholine receptor. This technique allowed to visualize increase in lateral

Table 2
Plant PA target proteins.

Protein	Activity	Function	Effect of PA binding	PA binding region ^a	References
ABI1	Phosphatase	Negative regulator of ABA signalling	Membrane recruitment/inhibition	⁶⁰ GSHGSESRKVLISRLNSPNLNMKESAAADIVVVDISAGD ⁹⁸	[65]
PP1c ^b	Phosphatase	Positive regulator of blue light signalling	Inhibition	GEFDNAGAMMSVD–L–CSFQILPKA	[78]
CDPK	Kinase	Response to ROS in root hair development and pathogens	Activation	ND	[68]
CTR1	Kinase	Negative regulation of ethylene response	Inhibition	654–821	[66]
MPK6	Kinase	Salt stress response	Activation	ND	[67]
PDK1	Kinase	Response to plant hormones, regulation of root hair growth and development	Inhibition	391–491	[68]
AGD7	Arf GTPase Activating Protein	Vesicular trafficking	Activation	ND	[79]
AtCP	Actin Capping Protein	Actin polymerization	Inhibition	ND	[69]
MGD1	MGDG synthase 1	Galactolipids synthesis	Activation	ND	[2]
PEAMT	Phosphoethanolamine N-Methyl-transferase	Phosphatidylcholine synthesis	Inhibition	ND	[80]
PEPC	PEP Carboxylase	Oxaloacetate synthesis	Inhibition	ND	[81, 82]
TGD2	ABC Transporter Subunit	Lipid import from ER to plastids	Binding	²¹⁰ SVGPLHPECCKEGLIV ²²⁵	[27]

Abbreviation ND: Not determined.

^a Phosphatidic acid binding region represents protein fragments that were found to be sufficient to bind PA. When available, amino acid sequence of the minimal PA binding region is indicated and essential amino acids are underlined.

^b Minimal PA binding domain of *Vicia fabia* PP1c was deduced from sequence homology with the PA binding domain of human PP1cy. Only conserved residues are listed.

packing of the lipid bilayer around the receptor and changes in the receptor conformation [50]. Conformational changes induced by PA can be associated with oligomer formation and recruitment of protein to membranes leading to enzyme activation (see for instance the work of [71,72] on the phospholipase PLC β 1 in mammals). Several works indicated in the past that PA and several anionic lipids such as PG can enhance MGDG synthase in plants (Fig. 1) [73–75]. We will hereafter analyze the specificity of its activation by PA.

6. Regulation of MGDG synthase by phosphatidic acid

MGDG synthase, MGD1, is essential for the formation of photosynthetic membranes [76]. Regulation of MGD1 by PA and PG was recently analyzed on native enzyme in leaf extracts and on the recombinant At Δ 1-137 MGD1 enzyme [2]. No activity was measured when the enzyme was totally depleted of lipids except for the supply of its own substrate DAG. However addition of a very low concentration of PA was sufficient to promote the activity. Enzyme activation was also possible with PG but required much higher concentrations. Activation constants were 0.2 mol% for PA and 5 mol% for PG. No activity was recorded with PA or PG in absence of DAG. These results therefore suggested an allosteric regulation of MGDG synthase by PA and PG. Binding of PA and PG on MGD1 was indeed verified by lipid/protein overlay assay. PG concentration in the envelope is close to 8 mol% and PA is not detected in the envelope. However activity of the native MGDG synthase in the chloroplast envelope lipid background was drastically reduced after the envelope was incubated in optimum condition for PA phosphatase, the lost activity being restored by resupplying PA. $K_{0.5}$ of the spinach chloroplast envelope MGDG synthase for PA was estimated to 0.6 mol%. This experiment indicated the crucial importance of a very low level of PA in the chloroplast envelope for MGD1 activity. Several molecular species of PA were able to activate the enzyme, some eukaryotic as well as prokaryotic molecular species, suggesting a possible regulation by different sources of cellular PA, from chloroplast and non-chloroplast origins. On the other hand, PG appeared also important for MGDG synthase activity since PA and PG did not activate the enzyme by the same process. The curve of enzyme velocity versus lipid activator concentration looked sigmoid with PA but hyperbolic with PG, indicative of a simpler way of interaction of the enzyme with PG than with PA. Although a higher concentration of PG was required to reach apparent maximum velocity, PG activation allowed a higher apparent maximum velocity than PA activation, closer to the true maximum velocity of the enzyme. Different and complementary activations were confirmed by observation of the synergic effects of PA and PG on the enzyme. Analysis of salt effects indicated hydrophobic interaction of PA with the enzyme, i.e. increased activation by PA with high salt concentration, and electrostatic interaction of PG, i.e. decreased activation by PG with high salt concentration, and lastly, point mutation of the enzyme allowed determination of 2 amino acids specifically important for activation by PG [2]. It is now important to understand the synergic effect of PA and PG on the MGDG synthase activity *in vivo*.

In leaves, PLD ζ 2 is a source of PA that can activate MGDG synthase since MGDG synthase activity is weaker in the *pld ζ 2* knock out mutant unless an exogenous source of PA is added [2]. With regards to the role of PLD ζ 2 under the initial stage of Pi deprivation and because PLD ζ 2 is located on the membrane of vacuole where Pi is stored (Fig. 1) [20,63], it has been proposed that PA produced by PLD ζ 2 can tune MGDG synthesis as a function of Pi availability. However, because of different roles of PA in multiple cellular functions, activation of MGD1 by PA suggests many different possibilities of control of chloroplast biogenesis through MGDG

synthesis. Import of non-chloroplast PA and balance between PG synthesis and galactolipid synthesis in the chloroplast envelope are points that will be interesting to study in the future.

7. Perspectives

In plants, PA is a central precursor in both phospholipid and galactolipid synthesis. Mutant analysis indicated that some specific enzymes involved in *de novo* PA synthesis such as several lyso-PA acyltransferases (for instance LPAT2 and ATS2) are vital for the plant. Some PA phosphatases (for instance PAH1, PAH2 and LPP γ) look also essential. It will be interesting to analyze what makes these enzymes essential. This must be related with control of expression of the proteins and regulation of enzyme activity and ultimately with modification of PA level. Two important points to consider will be the exact membrane location of these enzymes and the lipid substrates they can be supplied with, at this location. Another important point will be to characterize how modification of level of specific molecular species of PA can affect key target proteins such as, MGD1, the essential MGDG synthase in formation of photosynthetic membranes. Molecular tools to follow quantity and location of different molecular species of PA in the cell would add precious information to unravel the way PA acts as a signal in the plant cell.

Acknowledgements

Our research is supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and Université Joseph Fourier (UJF). CB is supported by a Marie-Curie FP7 fellowship from the European Union; YY is supported by a grant from the Tokyo Institute of Technology, Japan; EM and MB are supported by a blue sky grant from Agence Nationale de la Recherche, France. We thank Hiroyuki Ohta for his help in finding a financial support to YY.

References

- [1] K. Awai, E. Maréchal, M.A. Block, D. Brun, T. Masuda, H. Shimada, K. Takamiya, H. Ohta, J. Joyard, Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001) 10960–10965.
- [2] E. Dubots, M. Audry, Y. Yamaryo, O. Bastien, H. Ohta, C. Breton, E. Maréchal, M.A. Block, Activation of the chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase MGD1 by phosphatidic acid and phosphatidylglycerol, J. Biol. Chem. 285 (2010) 6003–6011.
- [3] N. Sato, M. Hagio, H. Wada, M. Tsuzuki, Requirement of phosphatidylglycerol for photosynthetic function in thylakoid membranes, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97 (2000) 10655–10660.
- [4] G.I. McFadden, M.E. Reith, J. Munholland, N. Lang-Unnasch, Plastid in human parasites, Nature 381 (1996) 482.
- [5] S. Kohler, C.F. Delwiche, P.W. Denny, L.G. Tilney, P. Webster, R.J. Wilson, J.D. Palmer, D.S. Roos, A plastid of probable green algal origin in *Apicomplexan* parasites, Science 275 (1997) 1485–1489.
- [6] E. Marechal, M.F. Cesbron-Delauw, The apicoplast: a new member of the plastid family, Trends Plant Sci. 6 (2001) 200–205.
- [7] X. Wang, S.P. Devaiah, W. Zhang, R. Welti, Signaling functions of phosphatidic acid, Prog. Lipid Res. 45 (2006) 250–278.
- [8] R. Welti, W. Li, M. Li, Y. Sang, H. Biesiada, H.E. Zhou, C.B. Rajashekar, T.D. Williams, X. Wang, Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D α in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*, J. Biol. Chem. 277 (2002) 31994–32002.
- [9] B.O. Bargmann, A.M. Laxalt, B. ter Riet, B. van Schooten, E. Merquiol, C. Testerink, M.A. Haring, D. Bartels, T. Munnik, Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants, Plant Cell Physiol. 50 (2009) 78–89.
- [10] W. Li, M. Li, W. Zhang, R. Welti, X. Wang, The plasma membrane-bound phospholipase D δ enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*, Nat. Biotechnol. 22 (2004) 427–433.
- [11] M. Uemura, R.A. Joseph, P.L. Steponkus, Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions), Plant Physiol. 109 (1995) 15–30.

- [12] M. Fritz, H. Lokstein, D. Hackenberg, R. Welti, M. Roth, U. Zahring, M. Fulda, W. Hellmeyer, C. Ott, F.P. Wolter, E. Heinz, Channeling of eukaryotic diacylglycerol into the biosynthesis of plastidial phosphatidylglycerol, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 4613–4625.
- [13] M. Frentzen, M. Neuburger, J. Joyard, R. Douce, Intracellular localization and substrate specificities of the mitochondrial acyl-CoA: sn-glycerol-3-phosphate O-acyltransferase and acyl-CoA: 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate O-acyltransferase from potato tubers and pea leaves, *Eur. J. Biochem.* 187 (1990) 395–402.
- [14] J. Ohlrogge, J. Browse, Lipid biosynthesis, *Plant Cell* 7 (1995) 957–970.
- [15] H.U. Kim, Y. Li, A.H. Huang, Ubiquitous and endoplasmic reticulum-located lysophosphatidyl acyltransferase, LPAT2, is essential for female but not male gametophyte development in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 17 (2005) 1073–1089.
- [16] G.M. Carman, S.A. Henry, Phosphatidic acid plays a central role in the transcriptional regulation of glycerophospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 37293–37297.
- [17] P.J. Eastmond, A.L. Quettier, J.T. Kroon, C. Craddock, N. Adams, A.R. Slabas, Phosphatidic acid phosphohydrolase 1 and 2 regulate phospholipid synthesis at the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 22 (2010) 2796–2811.
- [18] Y. Nakamura, R. Koizumi, G. Shui, M. Shimajima, M.R. Wenk, T. Ito, H. Ohta, Arabidopsis lipids mediate eukaryotic pathway of lipid metabolism and cope critically with phosphate starvation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (2009) 20978–20983.
- [19] J. Jouhet, E. Marechal, R. Bligny, J. Joyard, M.A. Block, Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation, *FEBS Lett.* 544 (2003) 63–68.
- [20] J. Misson, K.G. Raghothama, A. Jain, J. Jouhet, M.A. Block, R. Bligny, P. Ortet, A. Creff, S. Somerville, N. Rolland, P. Doumas, P. Nacry, L. Herrera-Estrella, L. Nussaume, M.C. Thibaud, A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102 (2005) 11934–11939.
- [21] R. Morcuende, R. Bari, Y. Gibon, W. Zheng, B.D. Pant, O. Blasing, B. Usadel, T. Czechowski, M.K. Udvardi, M. Stitt, W.R. Scheible, Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus, *Plant Cell Environ.* 30 (2007) 85–112.
- [22] A. Cruz-Ramirez, A. Oropeza-Aburto, F. Razo-Hernandez, E. Ramirez-Chavez, L. Herrera-Estrella, Phospholipase D2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103 (2006) 6765–6770.
- [23] M.Y. Li, R. Welti, X.M. Wang, Quantitative profiling of polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of Phospholipases D zeta 1 and D zeta 2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants, *Plant Physiol.* 142 (2006) 750–761.
- [24] N. Gaudé, Y. Nakamura, W.R. Scheible, H. Ohta, P. Dormann, Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of *Arabidopsis*, *Plant J.* 56 (2008) 28–39.
- [25] J. Jouhet, E. Marechal, M.A. Block, Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells, *Prog. Lipid Res.* 46 (2007) 37–55.
- [26] C. Benning, Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25 (2009) 71–91.
- [27] B. Lu, C. Benning, A 25-amino acid sequence of the *Arabidopsis* TGD2 protein is sufficient for specific binding of phosphatidic acid, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 17420–17427.
- [28] I. Nishida, Y. Tasaka, H. Shiraishi, N. Murata, The gene and the RNA for the precursor to the plastid-localized glycerol-3-phosphate acyltransferase of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.* 21 (1993) 267–277.
- [29] M. Frentzen, E. Heinz, T.A. McKeon, P.K. Stumpf, Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts, *Eur. J. Biochem.* 129 (1983) 629–636.
- [30] M. Ferro, D. Salvi, S. Brugiere, S. Miras, S. Kowalski, M. Louwagie, J. Garin, J. Joyard, N. Rolland, Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*, *Mol. Cell Proteomics* 2 (2003) 325–345.
- [31] B. Yu, S. Wakao, J. Fan, C. Benning, Loss of plastidic lysophosphatidic acid acyltransferase causes embryo-lethality in *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiol.* 45 (2004) 503–510.
- [32] H.U. Kim, A.H. Huang, Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 134 (2004) 1206–1216.
- [33] C. Xu, B. Yu, A.J. Cornish, J.E. Froehlich, C. Benning, Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of *Arabidopsis* mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3-phosphate acyltransferase, *Plant J.* 47 (2006) 296–309.
- [34] J. Joyard, R. Douce, Characterization of phosphatidate phosphohydrolase activity associated with chloroplast envelope membranes, *FEBS Lett.* 102 (1979) 147–150.
- [35] M.A. Block, A.-J. Dorne, J. Joyard, R. Douce, The phosphatidic acid phosphatase of the chloroplast envelope is located on the inner envelope membrane, *FEBS Lett.* 164 (1983) 111–115.
- [36] A. Malherbe, M.A. Block, J. Joyard, R. Douce, Feedback inhibition of phosphatidate phosphatase from spinach chloroplast envelope membranes by diacylglycerol, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 23546–23553.
- [37] Y. Nakamura, M. Tsuchiya, H. Ohta, Plastidic phosphatidic acid phosphatases identified in a distinct subfamily of lipid phosphate phosphatases with prokaryotic origin, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 29013–29021.
- [38] M.E. Fichera, D.S. Roos, A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites, *Nature* 390 (1997) 407–409.
- [39] S.A. Ralph, G.G. van Dooren, R.F. Waller, M.J. Crawford, M.J. Fraunholz, B.J. Foth, C.J. Tonkin, D.S. Roos, G.I. McFadden, Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast, *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2004) 203–216.
- [40] A.S. Tarun, A.M. Vaughan, S.H. Kappe, Redefining the role of de novo fatty acid synthesis in *Plasmodium* parasites, *Trends Parasitol.* 25 (2009) 545–550.
- [41] T.C. Santiago, R. Zufferey, R.S. Mehra, R.A. Coleman, C.B. Mamoun, The *Plasmodium falciparum* PfGatp is an endoplasmic reticulum membrane protein important for the initial step of malarial glycerolipid synthesis, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 9222–9232.
- [42] R.F. Waller, P.J. Keeling, R.G. Donald, B. Striepen, E. Handman, N. Lang-Unnasch, A.F. Cowman, G.S. Besra, D.S. Roos, G.I. McFadden, Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95 (1998) 12352–12357.
- [43] A.M. Vaughan, M.T. O'Neill, A.S. Tarun, N. Camargo, T.M. Phuong, A.S. Aly, A.F. Cowman, S.H. Kappe, Type II fatty acid synthesis is essential only for malaria parasite late liver stage development, *Cell Microbiol.* 11 (2009) 506–520.
- [44] E. Maréchal, N. Azzouz, C.S. de Macedo, M.A. Block, J.E. Feagin, R.T. Schwarz, J. Joyard, Synthesis of chloroplast galactolipids in apicomplexan parasites, *Eukaryot. Cell* 1 (2002) 653–656.
- [45] C. Bisanz, O. Bastien, D. Grando, J. Jouhet, E. Marechal, M.F. Cesbron Delauw, *Toxoplasma gondii* acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors, *Biochem. J.* 394 (2006) 197–205.
- [46] C. Botté, N. Saidani, R. Mondragon, M. Mondragon, G. Isaac, E. Mui, R. McLeod, J.F. Dubremetz, H. Vial, R. Welti, M.F. Cesbron Delauw, C. Mercier, E. Maréchal, Subcellular localization and dynamics of a digalactolipid-like epitope in *Toxoplasma gondii*, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 746–762.
- [47] A. Bhushan, M.G. McNamee, Correlation of phospholipid structure with functional effects on the nicotinic acetylcholine receptor. A modulatory role for phosphatidic acid, *Biophys. J.* 64 (1993) 716–723.
- [48] E.E. Kooijman, K.M. Carter, E.G. van Laar, V. Chupin, K.N. Burger, B. de Kruijff, What makes the bioactive lipids phosphatidic acid and lysophosphatidic acid so special? *Biochemistry* 44 (2005) 17007–17015.
- [49] J. Faraudo, A. Travesset, Phosphatidic acid domains in membranes: effect of divalent counterions, *Biophys. J.* 92 (2007) 2806–2818.
- [50] R.M. Sturgeon, J.E. Baenziger, Cations mediate interactions between the nicotinic acetylcholine receptor and anionic lipids, *Biophys. J.* 98 (2009) 989–998.
- [51] C.J. Loewen, M.L. Gaspar, S.A. Jesch, C. Delon, N.T. Ktistakis, S.A. Henry, T.P. Levine, Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid, *Science* 304 (2004) 1644–1647.
- [52] B.P. Young, J.J. Shin, R. Orii, J.T. Chao, S.C. Li, X.L. Guan, A. Khong, E. Jan, M.R. Wenk, W.A. Prinz, G.J. Smits, C.J. Loewen, Phosphatidic acid is a pH biosensor that links membrane biogenesis to metabolism, *Science* 329 (2010) 1085–1088.
- [53] E. Gout, R. Bligny, R. Douce, A.M. Boisson, C. Rivasseau, Early response of plant cell to carbon deprivation: in vivo ³¹P-NMR spectroscopy shows a quasi-instantaneous disruption on cytosolic sugars, phosphorylated intermediates of energy metabolism, phosphate partitioning, and intracellular pHs, *New Phytol.* 189 (2010) 135–147.
- [54] E. Maréchal, C. Miège, M.A. Block, R. Douce, J. Joyard, The catalytic site of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. Biochemical analysis of the structure and of the metal content, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 5714–5722.
- [55] C. Miège, E. Maréchal, M. Shimajima, K. Awai, M.A. Block, H. Ohta, K. Takamiya, R. Douce, J. Joyard, Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG, *Eur. J. Biochem.* 265 (1999) 990–1001.
- [56] Y. Nishiyama, H. Hardre-Lienard, S. Miras, C. Mège, M.A. Block, F. Revah, J. Joyard, E. Marechal, Refolding from denatured inclusion bodies, purification to homogeneity and simplified assay of MGDG synthases from land plants, *Protein Expr. Purif.* 31 (2003) 79–87.
- [57] E.E. Kooijman, V. Chupin, B. de Kruijff, K.N. Burger, Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid, *Traffic* 4 (2003) 162–174.
- [58] A. Begle, P. Tryoen-Toth, J. de Barry, M.F. Bader, N. Vitale, ARF6 regulates the synthesis of fusogenic lipids for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 4836–4845.
- [59] M. Zeniou-Meyer, A. Begle, M.F. Bader, N. Vitale, The Coffin–Lowry syndrome-associated protein RSK2 controls neuroendocrine secretion through the regulation of phospholipase D1 at the exocytotic sites, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1152 (2009) 201–208.
- [60] G. Li, H.W. Xue, *Arabidopsis* PLDzeta2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response, *Plant Cell* 19 (2007) 281–295.
- [61] M. Li, C. Qin, R. Welti, X. Wang, Double knockouts of phospholipases D21 and D22 in *Arabidopsis* affect root elongation during phosphate-limited growth but do not affect root hair patterning, *Plant Physiol.* 140 (2006) 761–770.
- [62] Y. Ohashi, A. Oka, R. Rodrigues-Pousada, M. Possenti, I. Ruberti, G. Morelli, T. Aoyama, Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation, *Science* 300 (2003) 1427–1430.

- [63] Y. Yamaryo, E. Dubots, C. Albrieux, B. Baldan, M.A. Block, Phosphate availability affects the tonoplast localization of PLD ζ 2, an *Arabidopsis thaliana* phospholipase D, FEBS Lett. 582 (2008) 685–690.
- [64] J. Jouhet, E. Maréchal, B. Baldan, R. Bligny, J. Joyard, M.A. Block, Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria, J. Cell Biol. 167 (2004) 863–874.
- [65] W. Zhang, C. Qin, J. Zhao, X. Wang, Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 101 (2004) 9508–9513.
- [66] C. Testerink, P.B. Larsen, D. van der Does, J.A. van Himbergen, T. Munnik, Phosphatidic acid binds to and inhibits the activity of *Arabidopsis* CTR1, J. Exp. Bot. 58 (2007) 3905–3914.
- [67] L. Yu, J. Nie, C. Cao, Y. Jin, M. Yan, F. Wang, J. Liu, Y. Xiao, Y. Liang, W. Zhang, Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*, New Phytol. 188 (2010) 762–773.
- [68] R.G. Anthony, R. Henriques, A. Helfer, T. Meszaros, G. Rios, C. Testerink, T. Munnik, M. Deak, C. Koncz, L. Bogre, A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*, EMBO J. 23 (2004) 572–581.
- [69] S. Huang, L. Gao, L. Blanchoin, C.J. Staiger, Heterodimeric capping protein from *Arabidopsis* is regulated by phosphatidic acid, Mol. Biol. Cell 17 (2006) 1946–1958.
- [70] E.E. Kooijman, D.P. Tieleman, C. Testerink, T. Munnik, D.T. Rijkers, K.N. Burger, B. de Kruijff, An electrostatic/hydrogen bond switch as the basis for the specific interaction of phosphatidic acid with proteins, J. Biol. Chem. 282 (2007) 11356–11364.
- [71] I. Litosch, R. Pujari, S.J. Lee, Phosphatidic acid regulates signal output by G protein coupled receptors through direct interaction with phospholipase C- β 1, Cell Signal. 21 (2009) 1379–1384.
- [72] E.M. Ross, D. Mateu, A.V. Gomes, C. Arana, T. Tran, I. Litosch, Structural determinants for phosphatidic acid regulation of phospholipase C- β 1, J. Biol. Chem. 281 (2006) 33087–33094.
- [73] J. Coves, J. Joyard, R. Douce, Lipid requirement and kinetic studies of solubilized UDP-galactose:diacylglycerol galactosyltransferase activity from spinach chloroplast envelope membranes, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 85 (1988) 4966–4970.
- [74] A.A. Kelly, A. Öhman, A. Sedoud, A. Wieslander, Membrane homeostasis mechanisms for plant glycosyl-transferases involved in galactolipid biosynthesis: biochemical and in-silico structure studies of key enzymes. in: C. Benning, J. Ohlrogge (Eds.), Current Advances in the Biochemistry and Cell Biology of Plant Lipids. Aardvark Global Publishing Company, Salt Lake City, 2007, pp. 25–31.
- [75] H. Ohta, M. Shimajima, T. Arai, T. Masuda, Y. Shioi, K. Takamiya, UDP-galactose:diacylglycerol galactosyltransferase in cucumber seedlings: purification of the enzyme and the activation by phosphatidic acid. in: J.C. Kader, P. Mazliak (Eds.), Plant Lipid Metabolism. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995, pp. 152–155.
- [76] K. Kobayashi, M. Kondo, H. Fukuda, M. Nishimura, H. Ohta, Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 104 (2007) 17216–17221.
- [77] J. Joyard, M. Ferro, C. Seignurin-Berny, D. Salvi, J. Garin, N. Rolland, Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism, Prog. Lipid Res. 49 (2010) 128–158.
- [78] A. Takemiya, K. Shimazaki, Phosphatidic acid inhibits blue light-induced stomatal opening via inhibition of protein phosphatase 1 [corrected], Plant Physiol. 153 (2010) 1555–1562.
- [79] M.K. Min, S.J. Kim, Y. Miao, J. Shin, L. Jiang, I. Hwang, Overexpression of *Arabidopsis* AGD7 causes relocation of Golgi-localized proteins to the endoplasmic reticulum and inhibits protein trafficking in plant cells, Plant Physiol. 143 (2007) 1601–1614.
- [80] R. Jost, O. Berkowitz, J. Shaw, J. Masle, Biochemical characterization of two wheat phosphoethanolamine N-methyltransferase isoforms with different sensitivities to inhibition by phosphatidic acid, J. Biol. Chem. 284 (2009) 31962–31971.
- [81] J.A. Monreal, F. McLoughlin, C. Echevarria, S. Garcia-Maurino, C. Testerink, Phosphoenolpyruvate carboxylase from C4 leaves is selectively targeted for inhibition by anionic phospholipids, Plant Physiol. 152 (2010) 634–638.
- [82] C. Testerink, H.L. Dekker, Z.Y. Lim, M.K. Johns, A.B. Holmes, C.G. Koster, N.T. Ktistakis, T. Munnik, Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants, Plant J. 39 (2004) 527–536.
- [83] P.D. Bates, T.P. Durrett, J.B. Ohlrogge, M. Pollard, Analysis of acyl fluxes through multiple pathways of triacylglycerol synthesis in developing soybean embryos, Plant Physiol. 150 (2009) 55–72.
- [84] S.C. Lung, R.J. Weselake, Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis, Lipids 41 (2006) 1073–1088.
- [85] T. Munnik, C. Testerink, Plant phospholipid signaling: “in a nutshell”, J. Lipid Res. 50 (Suppl) (2009) S260–265.

Références

Références

- Allen CF, Good P, Davis HF, Fowler SD** (1964) Plant and chloroplast lipids. I. Separation and composition of major spinach lipids. *Biochem Biophys Res Commun* **15**: 424-430
- Andersson MX, Goksor M, Sandelius AS** (2007) Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact sites between endoplasmic reticulum and chloroplasts. *J Biol Chem* **282**: 1170-1174
- Andersson MX, Larsson KE, Tjellstrom H, Liljenberg C, Sandelius AS** (2005) Phosphate-limited oat. The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J Biol Chem* **280**: 27578-27586
- Andersson MX, Stridh MH, Larsson KE, Liljenberg C, Sandelius AS** (2003) Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett* **537**: 128-132
- Andreou A, Brodhun F, Feussner I** (2009) Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog Lipid Res* **48**: 148-170
- Andreou A, Feussner I** (2009) Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* **70**: 1504-1510
- Austin RS, Vidaurre D, Stamatiou G, Breit R, Provart NJ, Bonetta D, Zhang J, Fung P, Gong Y, Wang PW, McCourt P, Guttman DS** (2011) Next-generation mapping of Arabidopsis genes. *Plant J* **67**: 715-725
- Awai K, Marechal E, Block MA, Brun D, Masuda T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H, Joyard J** (2001) Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16 : 3 and 18 : 3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 10960-10965
- Awai K, Xu C, Tamot B, Benning C** (2006) A phosphatidic acid-binding protein of the chloroplast inner envelope membrane involved in lipid trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10817-10822
- Axelsen KB, Palmgren MG** (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* **46**: 84-101
- Axelsen KB, Palmgren MG** (2001) Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. *Plant Physiol* **126**: 696-706
- Baldridge RD, Graham TR** (2012) Identification of residues defining phospholipid flippase substrate specificity of type IV P-type ATPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E290-298
- Baldridge RD, Graham TR** (2013) Two-gate mechanism for phospholipid selection and transport by type IV P-type ATPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E358-367
- Benning C** (2008) A role for lipid trafficking in chloroplast biogenesis. *Prog Lipid Res* **47**: 381-389
- Benning C** (2009) Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 71-91
- Benning C, Beatty JT, Prince RC, Somerville CR** (1993) The sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol is not required for photosynthetic electron transport in Rhodospirillum rubrum but enhances growth under phosphate limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1561-1565
- Benning C, Ohta H** (2005) Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants. *J Biol Chem* **280**: 2397-2400

- Benning C, Xu C, Awai K** (2006) Non-vesicular and vesicular lipid trafficking involving plastids. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 241-247
- Bertho P, Moreau P, Morre DJ, Cassagne C** (1991) Monensin blocks the transfer of very long chain fatty acid containing lipids to the plasma membrane of leek seedlings. Evidence for lipid sorting based on fatty acyl chain length. *Biochim Biophys Acta* **1070**: 127-134
- Blee E** (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci* **7**: 315-322
- Block MA, Dorne AJ, Joyard J, Douce R** (1983) Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. *J Biol Chem* **258**: 13281-13286
- Botte C, Jeanneau C, Snajdrova L, Bastien O, Imberty A, Breton C, Marechal E** (2005) Molecular modeling and site-directed mutagenesis of plant chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase reveal critical residues for activity. *J Biol Chem* **280**: 34691-34701
- Botte CY, Deligny M, Rocchia A, Bonneau AL, Saidani N, Hardre H, Aci S, Yamaryo-Botte Y, Jouhet J, Dubots E, Loizeau K, Bastien O, Brehelin L, Joyard J, Cintrat JC, Falconet D, Block MA, Rousseau B, Lopez R, Marechal E** (2011) Chemical inhibitors of monogalactosyldiacylglycerol synthases in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Chem Biol* **7**: 834-842
- Boudiere L, Botte CY, Saidani N, Lajoie M, Marion J, Brehelin L, Yamaryo-Botte Y, Satiat-Jeunemaitre B, Breton C, Girard-Egrot A, Bastien O, Jouhet J, Falconet D, Block MA, Marechal E** (2012) Galvestine-1, a novel chemical probe for the study of the glycerolipid homeostasis system in plant cells. *Mol Biosyst* **8**: 2023-2035, 2014
- Boudiere L, Michaud M, Petroustos D, Rebeille F, Falconet D, Bastien O, Roy S, Finazzi G, Rolland N, Jouhet J, Block MA, Marechal E** (2013) Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking. *Biochim Biophys Acta*
- Browse J, Warwick N, Somerville CR, Slack CR** (1986) Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the '16:3' plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* **235**: 25-31
- Bruce BD** (1998) The role of lipids in plastid protein transport. *Plant Mol Biol* **38**: 223-246
- Chow WS, Kim EH, Horton P, Anderson JM** (2005) Granal stacking of thylakoid membranes in higher plant chloroplasts: the physicochemical forces at work and the functional consequences that ensue. *Photochem Photobiol Sci* **4**: 1081-1090
- Clejan S, Dotson RS, Wolf EW, Corb MP, Ide CF** (1996) Morphological differentiation of N1E-115 neuroblastoma cells by dimethyl sulfoxide activation of lipid second messengers. *Exp Cell Res* **224**: 16-27
- Coleman JA, Vestergaard AL, Molday RS, Vilsen B, Andersen JP** (2012) Critical role of a transmembrane lysine in aminophospholipid transport by mammalian photoreceptor P4-ATPase ATP8A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 1449-1454
- Coves J, Joyard J, Douce R** (1988) Lipid requirement and kinetic studies of solubilized UDP-galactose:diacylglycerol galactosyltransferase activity from spinach chloroplast envelope membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 4966-4970
- D'Andrea LD, Regan L** (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* **28**: 655-662
- Devaux PF, Herrmann A, Ohlwein N, Kozlov MM** (2008) How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1591-1600
- Dormann P, Benning C** (2002) Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci* **7**: 112-118
- Dormann P, Hoffmann-Benning S, Balbo I, Benning C** (1995) Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. *Plant Cell* **7**: 1801-1810

- Douce R** (1985) Mitochondria in higher plants : structure, function and biogenesis. Academic Press New York
- Dubots E, Audry M, Yamaryo Y, Bastien O, Ohta H, Breton C, Marechal E, Block MA** (2010) Activation of the chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase MGD1 by phosphatidic acid and phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* **285**: 6003-6011
- Dubots E, Botte C, Boudiere L, Yamaryo-Botte Y, Jouhet J, Marechal E, Block MA** (2012) Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis. *Biochimie* **94**: 86-93
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G** (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**: 1005-1016
- Essigmann B, Guler S, Narang RA, Linke D, Benning C** (1998) Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1950-1955
- Frentzen M, Heinz E, McKeon TA, Stumpf PK** (1983) Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts. *Eur J Biochem* **129**: 629-636
- Froehlich JE, Benning C, Dormann P** (2001) The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis. *J Biol Chem* **276**: 31806-31812
- Gao H, Xu X** (2009) Depletion of Vipp1 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 affects photosynthetic activity before the loss of thylakoid membranes. *FEMS Microbiol Lett* **292**: 63-70
- Gomes E, Jakobsen MK, Axelsen KB, Geisler M, Palmgren MG** (2000) Chilling tolerance in *Arabidopsis* involves ALA1, a member of a new family of putative aminophospholipid translocases. *Plant Cell* **12**: 2441-2454
- Goodman CD, McFadden GI** (2007) Fatty acid biosynthesis as a drug target in apicomplexan parasites. *Curr Drug Targets* **8**: 15-30
- Gounaris K, Barber J** (1983) Monogalactosyldiacylglycerol: The most abundant polar lipid in nature. *Trends in Biochemical Sciences* **8**: 378-381
- Gourdon P, Liu XY, Skjorringe T, Morth JP, Moller LB, Pedersen BP, Nissen P** (2011) Crystal structure of a copper-transporting PIB-type ATPase. *Nature* **475**: 59-64
- Härtel H, Dormann P, Benning C** (2000) DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10649-10654
- Härtel H, Lokstein H, Dormann P, Grimm B, Benning C** (1997) Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **115**: 1175-1184
- Härtel H, Lokstein H, Dörmann P, Trethewey RN, Benning C** (1998) Photosynthetic light utilization and xanthophyll cycle activity in the galactolipid deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**: 407-417
- Hartmann MA, Benveniste P** (1987) Plant membrane sterols-isolation, identification, and biosynthesis. *Methods in Enzymology* **148**: 632-650
- Haverkate F, van Deenen LL** (1965) Isolation and chemical characterization of phosphatidyl glycerol from spinach leaves. *Biochim Biophys Acta* **106**: 78-92
- Heemskerk JW, Bogemann G, Scheijen MA, Wintermans JF** (1986) Separation of chloroplast polar lipids and measurement of galactolipid metabolism by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **154**: 85-91

- Heinz E** (1977) Enzymatic reactions in galactolipid synthesis. *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants*. Springer-Verlag, Berlin.: 102-120
- Heinz E, Roughan PG** (1983) Similarities and differences in lipid metabolism of chloroplasts isolated from 18:3 and 16:3 plants. *Plant Physiol* **72**: 273-279
- Holz G, Dormann P** (2007) Structure and function of glycoglycerolipids in plants and bacteria. *Prog Lipid Res* **46**: 225-243
- Hsieh MH, Goodman HM** (2005) The Arabidopsis IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant Physiol* **138**: 641-653
- Ibrahim A, Schutz AL, Galano JM, Herrfurth C, Feussner K, Durand T, Brodhun F, Feussner I** (2011) The Alphabet of Galactolipids in Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci* **2**: 95
- Ishikawa A, Tanaka H, Kato C, Iwasaki Y, Asahi T** (2005) Molecular characterization of the ZKT gene encoding a protein with PDZ, K-Box, and TPR motifs in Arabidopsis. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 972-978
- Jarvis P, Dormann P, Peto CA, Lutes J, Benning C, Chory J** (2000) Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the Arabidopsis MGD synthase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8175-8179
- Jelen F, Oleksy A, Smietana K, Otlewski J** (2003) PDZ domains - common players in the cell signaling. *Acta Biochim Pol* **50**: 985-1017
- Jouhet J, Dubots E, Maréchal E, Block M** (2010) Lipid Trafficking in Plant Photosynthetic Cells. *In* H Wada, N Murata, eds, *Lipids in Photosynthesis*, Vol 30. Springer Netherlands, pp 349-372
- Jouhet J, Marechal E, Baldan B, Bligny R, Joyard J, Block MA** (2004) Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol* **167**: 863-874
- Jouhet J, Marechal E, Bligny R, Joyard J, Block MA** (2003) Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Lett* **544**: 63-68
- Jouhet J, Maréchal E, Block MA** (2007) Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells. *Prog Lipid Res.* **46**: 37-55
- Joyard J, Douce R** (1982) The chloroplast envelope: structure and biochemical properties. *Prog Clin Biol Res* **102 Pt B**: 77-89
- Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, Rolland N** (2010) Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism. *Prog Lipid Res* **49**: 128-158
- Joyard J, Teyssier E, Mieg C, Berny-Seigneurin D, Marechal E, Block MA, Dorne AJ, Rolland N, Ajlani G, Douce R** (1998) The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiol* **118**: 715-723
- Kelly AA, Dormann P** (2002) DGD2, an arabidopsis gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. *J Biol Chem* **277**: 1166-1173
- Kelly AA, Froehlich JE, Dormann P** (2003) Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes DGD1 and DGD2 in Arabidopsis reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis. *Plant Cell* **15**: 2694-2706
- Kobayashi K, Awai K, Nakamura M, Nagatani A, Masuda T, Ohta H** (2009) Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation. *Plant Journal* **57**: 322-331

- Kobayashi K, Awai K, Takamiya K, Ohta H** (2004) Arabidopsis type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation. *Plant Physiol* **134**: 640-648
- Kobayashi K, Fukuda H, Baba S, Kondo M, Nishimura M, Takamiya K, Ohta H** (2006) Identification and characterization of a MGD1 knockout mutant in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **47**: S32-S32
- Kobayashi K, Kondo M, Fukuda H, Nishimura M, Ohta H** (2007) Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 17216-17221
- Koo AJ, Ohlrogge JB, Pollard M** (2004) On the export of fatty acids from the chloroplast. *J Biol Chem* **279**: 16101-16110
- Kroll D, Meierhoff K, Bechtold N, Kinoshita M, Westphal S, Vothknecht UC, Soll J, Westhoff P** (2001) VIPP1, a nuclear gene of Arabidopsis thaliana essential for thylakoid membrane formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4238-4242
- Kunst L, Samuels AL** (2003) Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog Lipid Res* **42**: 51-80
- Lenoir G, Williamson P, Puts CF, Holthuis JC** (2009) Cdc50p plays a vital role in the ATPase reaction cycle of the putative aminophospholipid transporter Drs2p. *J Biol Chem* **284**: 17956-17967
- Levano K, Punia V, Raghunath M, Debata PR, Curcio GM, Mogha A, Purkayastha S, McCloskey D, Fata J, Banerjee P** (2012) Atp8a1 deficiency is associated with phosphatidylserine externalization in hippocampus and delayed hippocampus-dependent learning. *J Neurochem* **120**: 302-313
- Levine T, Loewen C** (2006) Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 371-378
- Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, Bird D, Debono A, Durrett TP, Franke RB, Graham IA, Katayama K, Kelly AA, Larson T, Markham JE, Miquel M, Molina I, Nishida I, Rowland O, Samuels L, Schmid KM, Wada H, Welti R, Xu C, Zallot R, Ohlrogge J** (2013) Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book* **11**: e0161
- Li C, Wang Y, Liu L, Hu Y, Zhang F, Mergen S, Wang G, Schlappi MR, Chu C** (2011) A rice plastidial nucleotide sugar epimerase is involved in galactolipid biosynthesis and improves photosynthetic efficiency. *PLoS Genet* **7**: e1002196
- Loll B, Kern J, Saenger W, Zouni A, Biesiadka J** (2007) Lipids in photosystem II: interactions with protein and cofactors. *Biochim Biophys Acta* **1767**: 509-519
- Lopez-Marques RL, Poulsen LR, Hanisch S, Meffert K, Buch-Pedersen MJ, Jakobsen MK, Pomorski TG, Palmgren MG** (2010) Intracellular targeting signals and lipid specificity determinants of the ALA/ALIS P4-ATPase complex reside in the catalytic ALA alpha-subunit. *Mol Biol Cell* **21**: 791-801
- Lopez-Marques RL, Poulsen LR, Palmgren MG** (2012) A putative plant aminophospholipid flippase, the Arabidopsis P4 ATPase ALA1, localizes to the plasma membrane following association with a beta-subunit. *PLoS One* **7**: e33042
- Los DA, Mironov KS, Allakhverdiev SI** (2013) Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynth Res*
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275
- Marechal E, Miede C, Block MA, Douce R, Joyard J** (1995) The catalytic site of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. Biochemical analysis of the structure and of the metal content. *J Biol Chem* **270**: 5714-5722

- Masuda S, Harada J, Yokono M, Yuzawa Y, Shimojima M, Murofushi K, Tanaka H, Masuda H, Murakawa M, Haraguchi T, Kondo M, Nishimura M, Yuasa H, Noguchi M, Oh-Oka H, Tanaka A, Tamiaki H, Ohta H** (2011) A monogalactosyldiacylglycerol synthase found in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum* reveals important roles for galactolipids in photosynthesis. *Plant Cell* **23**: 2644-2658
- McDowell SC, Lopez-Marques RL, Poulsen LR, Palmgren MG, Harper JF** (2013) Loss of the *Arabidopsis thaliana* P(4)-ATPase ALA3 reduces adaptability to temperature stresses and impairs vegetative, pollen, and ovule development. *PLoS One* **8**: e62577
- Miege C, Marechal E, Shimojima M, Awai K, Block MA, Ohta H, Takamiya K, Douce R, Joyard J** (1999) Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. *Eur J Biochem* **265**: 990-1001
- Misson J, Raghothama KG, Jain A, Jouhet J, Block MA, Bligny R, Ortet P, Creff A, Somerville S, Rolland N, Doumas P, Nacry P, Herrerra-Estrella L, Nussaume L, Thibaud MC** (2005) A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11934-11939
- Mizusawa N, Wada H** (2012) The role of lipids in photosystem II. *Biochim Biophys Acta* **1817**: 194-208
- Moellering ER, Benning C** (2011) Galactoglycerolipid metabolism under stress: a time for remodeling. *Trends Plant Sci* **16**: 98-107
- Moellering ER, Muthan B, Benning C** (2010) Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science* **330**: 226-228
- Moon BY, Higashi S, Gombos Z, Murata N** (1995) Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6219-6223
- Morcuende R, Bari R, Gibon Y, Zheng W, Pant BD, Blasing O, Usadel B, Czechowski T, Udvardi MK, Stitt M, Scheible WR** (2007) Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant Cell Environ* **30**: 85-112
- Moreau P, Bessoule JJ, Mongrand S, Testet E, Vincent P, Cassagne C** (1998) Lipid trafficking in plant cells. *Prog Lipid Res* **37**: 371-391
- Morth JP, Pedersen BP, Buch-Pedersen MJ, Andersen JP, Vilsen B, Palmgren MG, Nissen P** (2011) A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 60-70
- Morth JP, Pedersen BP, Toustrup-Jensen MS, Sorensen TL, Petersen J, Andersen JP, Vilsen B, Nissen P** (2007) Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* **450**: 1043-1049
- Nakamura Y, Arimitsu H, Yamaryo Y, Awai K, Masuda T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H** (2003) Digalactosyldiacylglycerol is a major glycolipid in floral organs of *Petunia hybrida*. *Lipids* **38**: 1107-1112
- Nakamura Y, Koizumi R, Shui GH, Shimojima M, Wenk MR, Ito T, Ohta H** (2009) *Arabidopsis* lipins mediate eukaryotic pathway of lipid metabolism and cope critically with phosphate starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 20978-20983
- Natarajan P, Wang J, Hua Z, Graham TR** (2004) Drs2p-coupled aminophospholipid translocase activity in yeast Golgi membranes and relationship to in vivo function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10614-10619

- Nishida I, Murata N** (1996) Chilling sensitivity in plants and Cyanobacteria : The Crucial Contribution of Membrane Lipids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 541-568
- Nishiyama Y, Hardre-Lienard H, Miras S, Miege C, Block MA, Revah F, Joyard J, Marechal E** (2003) Refolding from denatured inclusion bodies, purification to homogeneity and simplified assay of MGDG synthases from land plants. *Protein Expr Purif* **31**: 79-87
- Noji T, Yamamoto T, Saito K, Fujimura-Kamada K, Kondo S, Tanaka K** (2006) Mutational analysis of the Lem3p-Dnf1p putative phospholipid-translocating P-type ATPase reveals novel regulatory roles for Lem3p and a carboxyl-terminal region of Dnf1p independent of the phospholipid-translocating activity of Dnf1p in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **344**: 323-331
- Ohlrogge J, Browse J** (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 957-970
- Ohta H, Shimojima M, Ookata K, Masuda T, Shioi Y, Takamiya K** (1995) A close relationship between increases in galactosyltransferase activity and the accumulation of galactolipids during plastid development in cucumber seedlings. *Plant and Cell Physiology* **36**: 1115-1120
- Okazaki Y, Otsuki H, Narisawa T, Kobayashi M, Sawai S, Kamide Y, Kusano M, Aoki T, Hirai MY, Saito K** (2013) A new class of plant lipid is essential for protection against phosphorus depletion. *Nat Commun* **4**: 1510
- Paulusma CC, Elferink RP** (2010) P4 ATPases--the physiological relevance of lipid flipping transporters. *FEBS Lett* **584**: 2708-2716
- Paulusma CC, Folmer DE, Ho-Mok KS, de Waart DR, Hilarius PM, Verhoeven AJ, Oude Elferink RP** (2008) ATP8B1 requires an accessory protein for endoplasmic reticulum exit and plasma membrane lipid flippase activity. *Hepatology* **47**: 268-278
- Pedersen BP, Buch-Pedersen MJ, Morth JP, Palmgren MG, Nissen P** (2007) Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* **450**: 1111-1114
- Pomorski T, Lombardi R, Riezman H, Devaux PF, van Meer G, Holthuis JC** (2003) Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. *Mol Biol Cell* **14**: 1240-1254
- Poulsen LR, Lopez-Marques RL, McDowell SC, Okkeri J, Licht D, Schulz A, Pomorski T, Harper JF, Palmgren MG** (2008) The Arabidopsis P4-ATPase ALA3 localizes to the golgi and requires a beta-subunit to function in lipid translocation and secretory vesicle formation. *Plant Cell* **20**: 658-676
- Poulsen LR, Lopez-Marques RL, Palmgren MG** (2008) Flippases: still more questions than answers. *Cell Mol Life Sci* **65**: 3119-3125
- Riechmann JL, Meyerowitz EM** (1997) MADS domain proteins in plant development. *Biol Chem* **378**: 1079-1101
- Roston R, Gao J, Xu C, Benning C** (2011) Arabidopsis chloroplast lipid transport protein TGD2 disrupts membranes and is part of a large complex. *Plant J* **66**: 759-769
- Roston RL, Gao J, Murcha MW, Whelan J, Benning C** (2012) TGD1, -2, and -3 proteins involved in lipid trafficking form ATP-binding cassette (ABC) transporter with multiple substrate-binding proteins. *J Biol Chem* **287**: 21406-21415
- Saito K, Fujimura-Kamada K, Furuta N, Kato U, Umeda M, Tanaka K** (2004) Cdc50p, a protein required for polarized growth, associates with the Drs2p P-type ATPase implicated in phospholipid translocation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **15**: 3418-3432

- Sakai H, Krizek BA, Jacobsen SE, Meyerowitz EM** (2000) Regulation of SUP expression identifies multiple regulators involved in arabidopsis floral meristem development. *Plant Cell* **12**: 1607-1618
- Sanda S, Leustek T, Theisen MJ, Garavito RM, Benning C** (2001) Recombinant Arabidopsis SQD1 converts udp-glucose and sulfite to the sulfolipid head group precursor UDP-sulfoquinovose in vitro. *J Biol Chem* **276**: 3941-3946
- Sebastian TT, Baldridge RD, Xu P, Graham TR** (2012) Phospholipid flippases: building asymmetric membranes and transport vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1821**: 1068-1077
- Shimajima M, Ohta H** (2011) Critical regulation of galactolipid synthesis controls membrane differentiation and remodeling in distinct plant organs and following environmental changes. *Prog Lipid Res* **50**: 258-266
- Shinoda T, Ogawa H, Cornelius F, Toyoshima C** (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* **459**: 446-450
- Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE** (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**: 674-679
- Solymosi K, Schoefs B** (2010) Etioplast and etio-chloroplast formation under natural conditions: the dark side of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. *Photosynth Res* **105**: 143-166
- Staehelin LA** (1997) The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J* **11**: 1151-1165
- Takahashi Y, Fujimura-Kamada K, Kondo S, Tanaka K** (2011) Isolation and characterization of novel mutations in CDC50, the non-catalytic subunit of the Drs2p phospholipid flippase. *J Biochem* **149**: 423-432
- Tavernier E, Le Quoc D, Le Quoc K** (1993) Lipid composition of the vacuolar membrane of *Acer pseudoplatanus* cultured cells. *Biochim Biophys Acta* **1167**: 242-247
- Tietje C, Heinz E** (1998) Uridine-diphospho-sulfoquinovose: diacylglycerol sulfoquinovosyltransferase activity is concentrated in the inner membrane of chloroplast envelopes. *Planta* **206**: 72-78
- Tjellstrom H, Andersson MX, Larsson KE, Sandelius AS** (2008) Membrane phospholipids as a phosphate reserve: the dynamic nature of phospholipid-to-digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants. *Plant Cell Environ* **31**: 1388-1398
- Tong L** (2013) Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell Mol Life Sci* **70**: 863-891
- Toyoshima C** (2008) Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* **476**: 3-11
- Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H** (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* **405**: 647-655
- Toyoshima C, Nomura H, Tsuda T** (2004) Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature* **432**: 361-368
- van 't Hof R, Demel RA, Keegstra K, de Kruijff B** (1991) Lipid-peptide interactions between fragments of the transit peptide of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and chloroplast membrane lipids. *FEBS Lett* **291**: 350-354
- van Besouw A, Wintermans JF** (1979) The synthesis of galactosyldiacylglycerols by chloroplast envelopes. *FEBS Lett* **102**: 33-37
- Van Besouw A, Wintermans JF, Bogemann G** (1981) Galactolipid formation in chloroplast envelopes. III. Some observations on galactose incorporation by envelopes with high and low content of diacylglycerol. *Biochim Biophys Acta* **663**: 108-120

- van der Mark VA, Elferink RP, Paulusma CC** (2013) P4 ATPases: Flippases in Health and Disease. *Int J Mol Sci* **14**: 7897-7922
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW** (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 112-124
- Vu HS, Tamura P, Galeva NA, Chaturvedi R, Roth MR, Williams TD, Wang X, Shah J, Welti R** (2012) Direct infusion mass spectrometry of oxylipin-containing Arabidopsis membrane lipids reveals varied patterns in different stress responses. *Plant Physiol* **158**: 324-339
- Wada H, Murata N** (2007) The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis. *Photosynth Res* **92**: 205-215
- Wang Z, Anderson NS, Benning C** (2013) The phosphatidic acid binding site of the Arabidopsis trigalactosyldiacylglycerol 4 (TGD4) protein required for lipid import into chloroplasts. *J Biol Chem* **288**: 4763-4771
- Wang Z, Xu C, Benning C** (2012) TGD4 involved in endoplasmic reticulum-to-chloroplast lipid trafficking is a phosphatidic acid binding protein. *Plant J* **70**: 614-623
- Webb MS, Green BR** (1991) Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids, Vol 1060. Elsevier, Amsterdam, PAYS-BAS
- Westphal S, Heins L, Soll J, Vothknecht UC** (2001) Vippl deletion mutant of Synechocystis: a connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis? *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4243-4248
- Westphal S, Soll J, Vothknecht UC** (2001) A vesicle transport system inside chloroplasts. *FEBS Lett* **506**: 257-261
- Xu C, Fan J, Cornish AJ, Benning C** (2008) Lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in Arabidopsis requires the extraplastidic TGD4 protein. *Plant Cell* **20**: 2190-2204
- Xu C, Fan J, Riekhof W, Froehlich JE, Benning C** (2003) A permease-like protein involved in ER to thylakoid lipid transfer in Arabidopsis. *EMBO J* **22**: 2370-2379
- Xu C, Yu B, Cornish AJ, Froehlich JE, Benning C** (2006) Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of Arabidopsis mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Plant J* **47**: 296-309
- Youssef A, Laizet Y, Block MA, Marechal E, Alcaraz JP, Larson TR, Pontier D, Gaffe J, Kuntz M** (2010) Plant lipid-associated fibrillin proteins condition jasmonate production under photosynthetic stress. *Plant J* **61**: 436-445
- Yu B, Benning C** (2003) Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in Arabidopsis. *Plant J* **36**: 762-770
- Yu B, Xu C, Benning C** (2002) Arabidopsis disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 5732-5737
- Zhang L, Kato Y, Otters S, Vothknecht UC, Sakamoto W** (2012) Essential role of VIPP1 in chloroplast envelope maintenance in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**: 3695-3707
- Zhang L, Sakamoto W** (2012) Possible function of VIPP1 in thylakoids: Protection but not formation? *Plant Signal Behav* **8**
- Zhang X, Oppenheimer DG** (2009) IRREGULAR TRICHOME BRANCH 2 (ITB2) encodes a putative aminophospholipid translocase that regulates trichome branch elongation in Arabidopsis. *Plant J* **60**: 195-206
- Zhao J, Wang C, Bedair M, Welti R, Sumner LW, Baxter I, Wang X** (2011) Suppression of phospholipase Dgammass confers increased aluminum resistance in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* **6**: e28086

Analyse de l'homéostasie des lipides membranaires d'*Arabidopsis thaliana*, par une stratégie de génétique chimique exploitant une nouvelle classe d'analogues du diacylglycérol

Le MGDG (monogalactosyldiacylglycerol) et le DGDG (digalactosyldiacylglycerol) sont les lipides les plus abondants des membranes du chloroplaste. Ils sont synthétisés exclusivement dans l'enveloppe plastidiale par l'action des MGDG synthases (MGD1, MGD2 et MGD3) et des DGDG synthases (DGD1 et DGD2). Les galactolipides sont essentiels pour la structuration des photosystèmes et la biogenèse des thylacoïdes. En carence de phosphate, les galactolipides deviennent une source de lipides pour composer certaines membranes en dehors du chloroplaste. Suivant une stratégie de criblage pharmacologique à haut débit, une nouvelle molécule appelée galvestine-1 a pu être identifiée et caractérisée comme un inhibiteur des MGDG synthases. La galvestine-1 agit par compétition avec le diacylglycérol. Cet outil moléculaire permet donc de perturber le système complet constitué par l'ensemble des réactions de synthèses, de conversions et de trafics lipidiques, aboutissant à cet état stable que nous appelons homéostasie des lipides. Le but de cette thèse est de mettre en évidence, à l'aide de la galvestine-1, de nouveaux acteurs ou nouvelles voies permettant l'établissement de l'homéostasie lipidique à l'échelle de la cellule végétale. Pour cela, j'ai réalisé un criblage de mutants EMS (methanesulfonate d'éthyle) dans le but d'isoler des mutants résistants à la galvestine-1 et d'identifier les gènes mutés conférant cette résistance. Des données transcriptomiques (Affymetrix genome array genechip, ATH1) d'*Arabidopsis thaliana* traité en présence de galvestine-1 ont par ailleurs été obtenues avant le début des travaux de thèse. Ces données ont permis de cibler des gènes dont l'expression variait et possiblement impliqués dans l'homéostasie lipidique. En parallèle de l'approche sans *a priori*, j'ai donc réalisé une étude suivant une stratégie de gènes candidats sur *ALA10*, un gène codant pour une flippase putative, sur-exprimé après traitement à la galvestine-1 et en carence de phosphate. Le second volet de cette thèse vise donc à comprendre la relation entre l'expression d'*ALA10* et les gènes impliqués dans la synthèse des galactolipides chez la plante.

MGDG (monogalactosyldiacylglycerol) and DGDG (digalactosyldiacylglycerol) are the most abundant membrane lipids of the chloroplast. They are synthesized exclusively in the chloroplast envelope by the action of MGDG synthases (MGD1, MGD2 and MGD3) and DGDG synthases (DGD1 and DGD2). Galactolipids are known to be essential for the structure (and function) of the photosystems and for the biogenesis of thylakoids. In phosphate deprivation, galactolipids become a source of lipid for other cell membranes, outside the chloroplast. Based on a high throughput chemical screen, a new molecule called galvestine-1 has been identified and characterized as an inhibitor of MGDG synthases. Galvestine-1 competes with the binding of the diacylglycerol substrate to MGDs. This molecular tool can be used to disturb the system comprising all lipid biosynthesis reactions, conversions, and lipid trafficking, responsible for the membrane lipid steady state observed at the whole cell level, or membrane lipid homeostasis. Perturbation of the system occurs at the level of MGDG synthases. The aim of this thesis is to use the effect of galvestine-1 to identify new actors or new pathways involved in the control of lipid homeostasis in plant cells. To this purpose, I designed and performed a screening of a collection of EMS (ethyl methanesulfonate) mutants, in order to isolate galvestine-1-resistant mutants and to identify mutated genes conferring this resistance. Transcriptomic data (Affymetrix genome array genechip, ATH1) of *Arabidopsis thaliana* treated in the presence of galvestine-1 had been obtained prior to the PhD project. These data were used to identify genes whose expression varied and possibly involved in lipid homeostasis. Based on a complementary candidate gene approach, I focused on *Ala10*, a putative flippase, which gene is over-expressed after treatment with galvestine-1 and following phosphate deprivation. The purpose of this second part of this thesis is to understand the relationship between the expression of *ALA10* and genes involved in galactolipid synthesis in plants.